



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA.**

***Epigenética en la enfermedad renal:  
Investigación de las proteínas BET como potenciales  
dianas terapéuticas.***

**Jose Luis Morgado Pascual.**

**Madrid 2018.**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

***Epigenética en la enfermedad renal:  
Investigación de las proteínas BET como potenciales  
dianas terapéuticas.***

***Memoria que presenta el licenciado en Biología***

***Jose Luis Morgado Pascual***

***para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid***

**Directores de Tesis: Marta Ruiz-Ortega y Jesús Egido de los Ríos**  
**Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz**  
**Universidad Autónoma de Madrid.**



Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Doña Marta Ruiz-Ortega, profesor contratado Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid, CERTIFICAN:

Que Don Jose Luis Morgado Pascual, Licenciado en Biología por la Universidad de Extremadura, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “*Epigenética en la enfermedad renal: Investigación de las proteínas BET como potenciales dianas terapéuticas.*”, que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 6 de Abril de 2018.

Los directores de tesis,

Dr. Jesús Egido de los Ríos

Dra. Marta Ruiz-Ortega

*A Sandra*  
*A mi Familia*

*“Pues ahora que has terminado, podrías intentar hacer un Master, y hablamos con Marta, para ver si puedes hacer el doctorado aquí en el laboratorio ”.*

Esa fue la primera frase que escuché, cuando llamé a Sandra, para decirle que, por fin, había terminado la carrera. Cambiar de ciudad era un paso gigante para mí, no cabía ninguna duda. Yo, que en mi vida había salido de Badajoz, me veía en la situación de dejarlo todo, mis amigos y mi familia, para empezar una nueva etapa en Madrid. Así que, con mis recuerdos, y todavía abrumado por la nostalgia y el terror a lo desconocido, me lie la manta a la cabeza, y emprendí camino a ciudad capital. La que iba a ser mi jefa, Marta, me brindó la ocasión de entrar en el laboratorio. La llamo jefa por mera formalidad, ya que después de lo vivido no puedo sino estarle eternamente agradecido por darme esta oportunidad y confiar en mí. Mis primeros pasos, no fueron fáciles. Nunca había trabajado en un laboratorio, y menos aún en uno tan grande y con tanta gente, pero allí estaba yo, con mi acento extremeño, detrás de Sandra, sin atreverme a tocar absolutamente nada para no cagarla. Pero poco a poco empecé a conocer a todas esas personas que para bien o para mal, formarían parte de mi vida para siempre. Recuerdo especialmente, mi paso por el Master de Farma, junto con esas dos súper personas, Alfonso y Ernesto, y esas conversaciones en los descansos y fuera del ámbito estrictamente académico, que empezaran como empezaran... siempre acabábamos hablando de drogas (y lo malas que son, por supuesto). Recuerdo también, esas figuras autoritarias que suponían para mi Luis, Jose Luis, Carmen o Juan, y lo que suponía cruzarme con ellos por los pasillos, y no saber si saludarlos o no, para más adelante descubrir que con Juan me hace falta una cerveza para pasarme toda una noche contando chistes, o descubrir que Luis tiene alma de gamer. Conseguí poder pedir la Conchita con Jesús, y para mi sorpresa me la dieron. Se abrió ante mí, un periodo de tres años para aprender todo lo que pudiera. Atrás quedan las PCRs puestas al revés y los western cargados con el culo (ahora me río.....). Recuerdo que el primer día después de la resolución de la conchita, una de las primeras personas que me felicitaron, fue ese pedazo de hombre, que por aquel entonces no sabía ni como se llamaba, y ahora no podría olvidarlo. Kike se convirtió desde el principio en uno de mis grandes apoyos y actualmente en uno de mis grandes amigos, para terminar siendo como un hermano para mí. Recuerdo también, el abrazo de Jonay cuando me felicitó por la beca, y como a partir de ese momento supe que compartiríamos grandes momentos en el labo. Me presentaron a la gente de mi grupo, y así conocí a Macarena, Raúl, Raquel, Mati y Carolina, personas magníficas de las que aprendí un montón en las comidas, ya sea de la fauna típica chilena, conocimientos deportivos o asuntos políticos.

Todo estaba dividido por grupos, tanto la gente como los reactivos. *"Preguntale a Susana "*, madre mía, cuantas veces habré escuchado eso. Persona con un fuerte carácter, capaz donde las haya, supe que era una de las chicas importantes allí y debía caerle bien. No sé si realmente lo conseguí porque a día de hoy me llama mosca cojonera (yo creo que lo dice en serio). Conmigo, ese año, pidió la conchita una de las personas que a la larga sería de las más importantes en mi paso por el laboratorio, Don Cristian González. Que podría decir de este señor, excelente investigador, mejor persona. Siempre tenía un momento para mi estuviera haciendo lo que estuviera haciendo, junto con sus excelentes consejos y terapias psicológicas, no puedo sino llevarme conmigo y para siempre a una de las mejores personas que he conocido. Con poca gente, nada más conocerlas, sientes que te vas a llevar bien, pero una de ellas era esa chica de ojos azules que no paraba de hablar. Patri no solo ha sido una persona importante en el laboratorio sino también fuera de él. También iba conociendo a gente de otros grupos, María Valvanera, pero que clase de nombre es ese, aunque era la primera vez que lo oía, tardé poco en ver que era una persona increíble, y además mejor no le pueden ir las cosas. Los días iban pasando, y personas con las que había compartido muchas cosas, se marchaban, como Priscila, Elisa, Belén, Irene Buendía o Sergio Berzal, para dejar paso a nuevos becarios y postdoctorales. Gente como Alberto Ruiz, que es un tío impresionante al que le va a ir genial haga lo haga. Como Cristina García, gran fichaje con un humor increíble y simpática a rabiar, o como Raka, que se puede decir de una persona que por propia voluntad aprende a tocar el ukelele, pura espontaneidad que sabe sacarte una sonrisa con cualquier chiste, bueno, o por lo menos con eso a lo que ella llama chistes. Gente como Don Miguel Fontecha, investigador de guante blanco (literalmente....) o Juan Manuel Amaro. Personas excelentes y divertidas que no hacen otra cosa nada más que meterte un segundo por vuelta en los cars, los muy asquerosos. Cuando me presentaron a Nerea, realmente creí que poco tendría en común con ella. Una chica que hizo el doctorado en el CNIC y venía con un Nature Medicine debajo del brazo, demasiado para mí, pensé. Cómo imaginar que era una chica cercana y sincera de la que solo puedes sacarle buenos consejos y conversaciones para el recuerdo. Nunca imaginé que coincidiría con paisanos en el laboratorio, pero como de extremeños está lleno el mundo, pues me encontré con Diego Martin. Un futuro gran médico/investigador con un humor único con el me he reído muchísimo en el laboratorio. Y hablando de humor único, como olvidarme de Lara, que ha sido la persona que más veces me ha llamado calvo en mi cara y está viva para contarlo. Con los primeros resultados, se presentaban las oportunidades de ir a los primeros congresos. Jamás olvidaré ese viaje a Chicago con Ana Sanz, Laura Márquez y esa rubia de apellido impronunciable, Olha Zhenyukh. Fue inolvidable tanto por la compañía como por la experiencia.

Después de tanta lucha, tanto trabajo y pensando ya en el final de mi tesis, quien me iba a decir que el destino me dejaba lo mejor para el final. Melanie y Laura González han sido fundamentales en esta última etapa. Cuando vi aparecer a Melanie por primera vez en el laboratorio, pensé que jamás cruzaría palabra con ella, tan seria y tan imponente, daba un poquito de miedo, pero ya sabemos que es todo fachada. Eres una chica increíble, simpática, a la que nunca he visto rechazar un plan para salir por ahí, y seguro que de aquí en adelante tendrás resultados como para leer dos tesis por lo menos. Algo similar me pasó con Laura, que aunque tardé en romper el hielo, me llevó poco tiempo en sentir una complicidad terrible con ella. Ha cambiado en parte mi forma de ser con su manera de entender la vida, y aunque a veces saca un carácter que se las trae, me ha hecho recuperar parte de la inocencia que con los años vas perdiendo inevitablemente. Estoy seguro que de aquí en adelante todo irá de mejor en mejor para ti. Seguramente me quede a muchísima gente en la memoria, como Alejandra, o todas las chicas de Carmen, Luna, Laura López, Ana Melgar y Susana, es pedazo de chileno Lucas o Carmencilla, pero eso no hace que piense que son personas geniales de las que me llevo un magnífico recuerdo.

No quisiera escribir esta tesis, sin acordarme de los míos, mi familia. Muchísimas gracias a mis hermanas y a mis padres por todo el apoyo que me han dado, por todas esas llamadas que aunque nunca se lo digo, me alegran muchas tardes de soledad en Madrid, sobre todo en esta última etapa.

Por último, y aunque cronológicamente esta antes de todo lo vivido aquí, me queda agradecer a mi mujer, a mi compañera, todo lo que ha hecho por mí a todos los niveles en estos cinco años. Días de trabajos, comidas y sobremesas memorables. La gran suerte que he tenido es que la persona a la que más quiero me ha guiado a través de este periodo. Sé que parece un cliché, pero nada de lo que hay escrito en esta tesis habría sido posible sin su ayuda, y aunque hemos tenido altibajos, jamás me arrepentiré de haber venido a Madrid a compartir mi vida contigo, y lo que con seguridad, nos queda por vivir.

No puedo sino daros las gracias por todo lo vivido, por multitud de consejos y momentos inolvidables que son míos para siempre.....

Jose Luis Morgado Pascual

Corto y cierro.

## ÍNDICE



<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	3
<b>ABREVIATURAS</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN</b>	11
1.- La enfermedad renal crónica: situación actual.	13
2.- Mecanismos que se activan en el daño renal.	14
2.1- Proceso inflamatorio.	14
2.2- Vía de señalización del factor nuclear $\kappa B$ (NF- $\kappa B$ ).	15
2.3- Respuesta inmune.	18
2.4- Proceso fibrótico.	20
3.- Epigenética.	22
3.1- Las proteínas BET (Bromodomain and extra-terminal proteins).	24
3.2- BRD4.	25
3.3- Factor de elongación transcripcional positivo $\beta$ (P-TEFb).	26
3.4- Inhibidores de proteínas BET. Descripción de JQ1.	27
<b>HIPÓTESIS</b>	35
<b>OBJETIVOS</b>	37
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	43
1.- Modelos experimentales.	43
1.2.- Modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO).	44
1.3.- Modelo de infusión de Angiotensina II.	45
1.4.- Modelo de glomerulonefritis inmune.	46
2.- Estudios in vitro	47
2.1.- Cultivos celulares	47
2.2.- Tratamiento de los cultivos celulares con JQ1	47
3.- Estudios de histología e inmunohistoquímica	48
3.1.- Morfología Renal.	48
3.2.- Inmunohistoquímica.	48
3.3.- Inmunofluorescencia.	50
3.4.- Inmunofluorescencia in vitro.	51
4.- Estudios de expresión génica.	52
5.- Estudios de expresión proteica.	53
5.1- ELISA	54

6.- Inmunoprecipitación de cromatina (CHIP).....	55
6.1.- Estudios CHIP in vitro.....	55
6.2.- Estudios CHIP in vivo.....	55
7.- Arrays de expresión génica en perfiles humanos.....	56
8.- Estudios de Silenciamiento génico.....	56
9.- El análisis estadístico.....	57
<b>RESULTADOS</b> .....	61
1.- Efecto de la inhibición de proteínas BET en la respuesta inflamatoria renal experimental.....	63
1.1.- El inhibidor de proteínas BET, JQ1, modula la expresión de genes pro-inflamatorios en células renales en cultivo.....	63
1.2.- La inhibición de las proteínas BET, modula la respuesta inflamatoria en diferentes modelos experimentales de daño renal.....	68
2.- La inhibición de las proteínas BET bloquea la activación de la ruta de NF-κB en el daño renal experimental.....	79
3.- JQ1 inhibe la respuesta inflamatoria Th17 en la inflamación renal experimental.....	82
4.- La inhibición de proteínas BET disminuye la fibrosis renal.....	86
4.1.- El bloqueo de las proteínas BET disminuye la fibrosis en un modelo de nefritis inmune producido por un suero anti-membrana basal glomerular (NTS).....	86
4.2.- El tratamiento con JQ1 inhibe el proceso fibrótico en un modelo de obstrucción unilateral del uréter.....	88
4.3.- El bloqueo de las proteínas BET regula SOX9 en diferentes modelos de daño renal.....	90
4.4.- El bloqueo de las proteínas BET produce una inhibición de la fibrosis en células en cultivo.....	93
5.- La inhibición de proteínas BET mejora la función renal en diferentes modelos de daño renal.....	98
<b>CONCLUSIONES</b> .....	121
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	129
<b>ANEXO</b> .....	153

## RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud muy relevante a nivel mundial, que desemboca en enfermedad renal terminal o muerte por eventos cardiovasculares. En los últimos años, el número de pacientes con ERC está aumentando debido a la incidencia de la diabetes, la hipertensión y la obesidad. Desafortunadamente, los tratamientos actuales solo consiguen retardar la progresión de esta enfermedad. Los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN y las modificaciones de histonas, regulan diferentes perfiles de expresión génica en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. La familia de proteínas BET “*bromodomain and extra-terminal*”, BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT, participan en el desarrollo de tumores, autoinmunidad, inflamación y fibrosis y a través de sus bromodominios pueden regular la transcripción génica reconociendo específicamente residuos de lisina acetilados en histonas y otras proteínas nucleares. Los inhibidores de proteínas BET, como JQ1, actúan bloqueando la unión de los bromodominios a proteínas acetiladas. Aunque estos inhibidores han demostrado efectos beneficiosos en patologías proliferativas e inflamatorias, apenas existen estudios en enfermedades renales. En este sentido, se ha descrito que factores implicados en la ERC como el estrés oxidativo, inflamación o las toxinas urémicas pueden inducir cambios epigenéticos.

Por todo esto, el objetivo de esta tesis ha sido investigar si la inhibición de las proteínas BET podría ser una nueva opción terapéutica en patologías renales. Para ello, se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* en tres modelos experimentales de daño renal: Un modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO); un modelo de administración sistémica de Angiotensina II; y un modelo de nefritis inmune producido por la administración de un suero nefrotóxico anti-membrana basal glomerular (NTS). Los estudios de expresión génica realizados en células estimuladas con TNF- $\alpha$  *in vitro* y tratadas con JQ1 o el silenciador de BRD4, mostraron la capacidad de las proteínas BET de regular diferentes procesos biológicos, como la inflamación y la respuesta inmune. Los estudios *in vivo* mostraron una bajada en la respuesta inflamatoria en los animales con daño renal pretratados con JQ1 frente a los ratones no tratados. El complejo P-TEFb se ha descrito como un elemento regulador de muchos genes pro-inflamatorios. Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina *in vivo* e *in vitro* demostraron que JQ1 altera la asociación directa de BRD4 con histonas acetiladas y reduce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias P-TEFb dependiente, incluidas CCL2, CCL5 e IL6. Muchos genes inhibidos por JQ1, están bajo el control transcripcional de NF- $\kappa$ B. Se comprobó que tanto en modelos de daño renal como en células tratadas con TNF- $\alpha$ , JQ1 redujo la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B. La respuesta inmune Th17 contribuye a la patogénesis del daño renal tanto de origen inmune como no inmune. Observamos que el tratamiento con JQ1 disminuyó la producción renal de IL-17A, la principal citoquina efectora de la respuesta Th17 en varios modelos experimentales de daño renal. El modelo de glomerulonefritis inmune, se caracteriza por proliferación extracapilar, fibrosis mesangial (con aumento de Colágeno tipo IV) y daño podocitario. En el modelo de UUO los riñones obstruidos presentaron fibrosis túbulo-intersticial, asociada a aumento de expresión génica de factores profibróticos (TGF- $\beta$  y PAI-1) y acumulación de componentes de matriz extracelular (Fibronectina y Colágeno tipo I). En ambos modelos el tratamiento con JQ1 disminuyó la fibrosis renal. El factor de transcripción SOX9 está implicado en regeneración, proliferación y migración. En ambos modelos, los riñones dañados presentaban aumento de la expresión nuclear de SOX9, localizado principalmente en áreas fibróticas y colocalizando con células  $\alpha$ -actina positivas. En estudios *in vitro*, JQ1 inhibió la producción de Colágeno y Fibronectina y la localización nuclear de SOX9 inducida por TGF- $\beta$ . Además, el silenciamiento de SOX9 disminuyó la producción de proteínas de matriz. Por último se evaluó el efecto del bloqueo de proteínas BET en la función renal estudiando el modelo de nefritis inmune. El tratamiento de los ratones con JQ1 mejoró la función renal (creatinina sérica/albumina urinaria) y expresión renal de biomarcadores de daño (N-gal y Kim1). Estos resultados sugieren que los inhibidores de BET podrían tener aplicaciones terapéuticas importantes en enfermedades renales.

## SUMMARY

Chronic kidney disease (CKD) is a major health problem that has reached epidemic proportions and it may lead to end-stage renal disease or early cardiovascular death. Moreover, the increasing incidence of diabetes, hypertension and obesity will raise the number of patients with CKD in the near future. Available clinical treatments for CKD only retard disease progression. Epigenetic mechanisms, especially DNA methylation and histone modifications, are dynamic processes and mediate the different gene expression profiles in normal and diseased states. Oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and uremic toxins might induce epigenetic modifications involved in alterations of immune response, fibrosis and cardiovascular disease in renal patients. The bromodomain and extraterminal (BET) protein family (BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT) participate in tumor development, infections, autoimmunity and inflammation. Bromodomains in BET proteins bind to acetylated lysine residues on histones and other nuclear proteins to regulate the transcriptional program. Selective bromodomain inhibitors block the interaction between BET proteins and acetylated proteins. These inhibitors have beneficial effects on malignancy and experimental inflammation in mouse models, but information about renal diseases is scarce. Renal inflammation plays a key role in the onset and progression of immune and non-immune kidney diseases. Therefore, the search for novel anti-inflammatory pharmacological targets is of key interest in renal pathology.

Data presented in this thesis showed that BET inhibition abrogated experimental renal inflammation, as demonstrated in murine models of unilateral ureteral obstruction, anti-membrane basal glomerulonephritis and Angiotensin II-infusion. The *in vitro* evaluation of TNF- $\alpha$  inducible genes using a whole-genome gene expression array in human renal proximal tubular epithelial cells showed that BET inhibition modulates several biological processes, including inflammation and immune response. JQ1 displaces BRD4 and consequently P-TEFb from promoter regions, therefore inhibiting gene transcription. Many JQ1 down-regulated genes are under the control of NF- $\kappa$ B. Interestingly, some of them are P-TEFb dependent (IL6, CCL2, CCL5 and CCL20), while others are P-TEFb independent. BRD4 gene silencing and chromatin immunoprecipitation experiments demonstrated that JQ1 alters the direct association of BRD4 with acetylated histone-packaged cytokine promoters and reduces transcription of P-TEF-dependent genes (CCL2, IL6 and CCL5), and therefore might regulate renal inflammation by chromatin remodeling. In damaged kidneys and in TNF- $\alpha$ -treated renal cells, JQ1 reduced nuclear levels of RelA and inhibited NF- $\kappa$ B-mediated gene expression, suggesting that JQ1 could inhibit P-TEFb-independent/NF- $\kappa$ B controlled genes by its direct effect on NF- $\kappa$ B pathway. The Th17 immune response contributes to the pathogenesis of renal diseases, including non-immune nephropathies. In UUO kidneys, the main Th17 effector cytokine, IL-17A was markedly downregulated by JQ1. These results show that inhibition of BET proteins reduces renal inflammation by several mechanisms: chromatin remodeling in promoter regions of specific genes, blockade of NF- $\kappa$ B pathway activation, and modulation of the Th17 immune response. These results suggest that inhibitors of BET proteins could have important therapeutic applications in inflammatory and fibrotic renal diseases. Importantly in the model of anti-membrane basal glomerulonephritis induced by nephrotoxic serum, BET inhibition ameliorates renal function and decreased renal expression of biomarkers of renal damage (N-Gal and Kim1). BET inhibitors can also diminish renal fibrosis. In obstructed kidneys gene overexpression of pro-fibrotic factors and matrix-related components (Fibronectin and procollagen type I) was markedly diminished in JQ1-treated mice. Similar downregulation of matrix components were also found in injured kidneys by immunonephritis. In both models, nuclear localization of SOX9 was described, located mainly in fibrotic areas. In mice treated with JQ1 renal SOX9 levels were downregulated. *In vitro*, JQ1 blocked SOX9 nuclear localization and SOX9 gene silencing inhibited collagen production induced by TGF- $\beta$ . These data suggest that JQ1 inhibited fibrosis by modulation of SOX9. These results suggest that BET inhibitors could have important therapeutic applications in kidney diseases.

ABREVIATURAS

Relación de acrónimos y abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente uso en el lenguaje científico:

aa	Aminoácidos.
Ang II	Angiotensina II.
ARA II	Antagonistas de los receptores de angiotensina tipo I.
BAF	<i>Barrier to autointegration factor.</i>
BRD2	<i>Bromodomain-containing protein 2.</i>
BRD3	<i>Bromodomain-containing protein 3.</i>
BRD4	<i>Bromodomain-containing protein 4.</i>
BRDT	<i>Bromodomain testis-specific protein.</i>
CCL19	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 19.</i>
CCL21	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 21.</i>
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo.
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand.</i>
CXCL10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10.</i>
CXCL13	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 13.</i>
DHR	Dominio de homología Rel.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
ERC	Enfermedad renal crónica.
ERK	Quinasa de regulación de señales intracelulares.
ET-1	Endotelina 1.
HMG	Dominio de unión al ADN de alta movilidad.
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1.
iECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$ .
IgA	Inmunoglobulina A.

## ABREVIATURAS

IL10	Interleuquina-10.
IL-1 $\beta$	Interleuquina-1 $\beta$ .
IL21	Interleuquina-21.
IL23	Interleuquina-23.
IL4	Interleuquina-6.
IL6	Interleuquina-6.
IL8	Interleuquina-8.
Irf4	Factor regulador del interferón 4.
Lys	Lisina.
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno.
MCAP	Proteína mitótica asociada a cromatina.
MCP-1/CCL2	Proteína quimioatrayente de monocitos-1.
MME	Matriz extracelular.
MMPs	Metaloproteinasas de matriz.
NELF	Factor negativo de elongación.
NEMO	Modulador esencial de NF-kB.
NF-kB	Factor nuclear-kB.
NIK	Quinasa inductora de NF-kB.
NTS	<i>Nefrotoxic serum</i> .
OPN	Osteopontina.
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
P-TEFb	Factor de elongación transcripcional positivo b.
PTHrP	Proteína relacionada con la Paratohormona.
PTMs	Modificaciones post-transcripcionales.
RANTES/CCL5	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted.
ROR $\gamma$	Factor de transcripción de tipo huérfano del receptor de ácido retinoico.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
Ser	Serina.

siRNA	<i>Small interfering RNA.</i>
SLN	Señal de localización nuclear.
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.
STAT3	Factor activador de la transcripción 3.
sTNFr	Receptor soluble del Factor de necrosis tumoral.
TEM	Transición epitelio mesénquima.
TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento transformante- $\alpha$ .
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante- $\beta$ .
Th	Linfocito T Helper.
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .
TRAFs	Factores asociados a TNF.
TWEAK	Citoquina inductora de apoptosis semejante a TNF.
UUO	Obstrucción unilateral del ureter.
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1.</i>
VDRA	Agonista de los receptores de la vitamina D.
VDRE	Elementos de respuesta a VDR.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -actina de músculo liso.

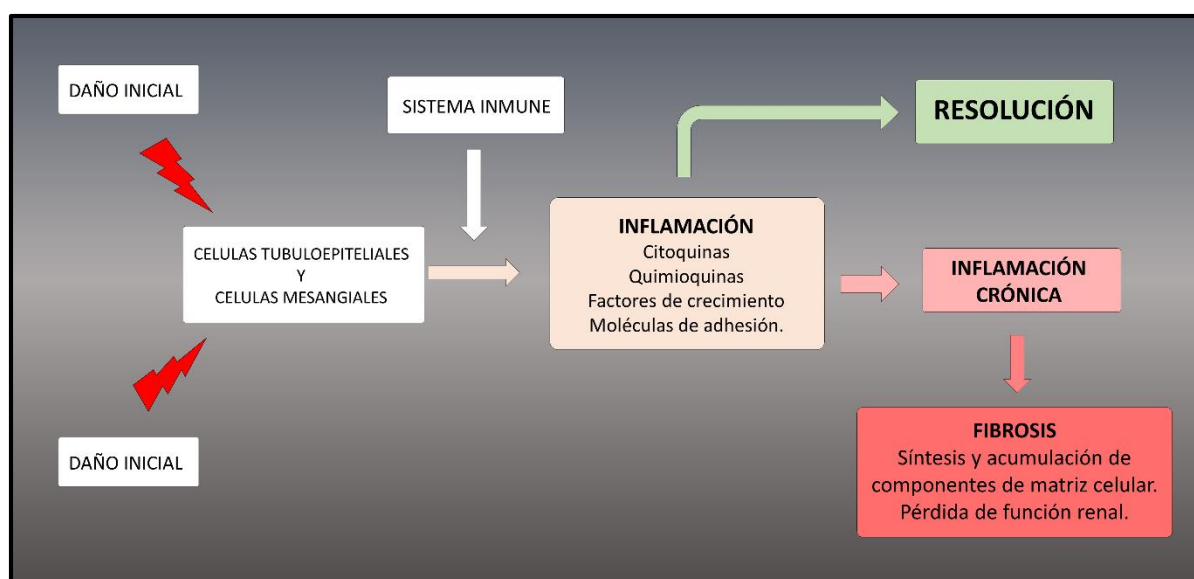
# **INTRODUCCIÓN**



## 1.- La enfermedad renal crónica: situación actual.

La enfermedad renal crónica (ERC), independientemente de su etiología, es un problema importante de salud pública en nuestra sociedad debido a su fuerte impacto en la calidad de vida de los pacientes y su elevado coste económico. Se estima que afecta a más del 10 % de la población de la unión europea y que 1 de cada 3 personas está en riesgo de desarrollarla (1). Existen muchos tipos de daño que pueden dar origen a un fallo renal, como los de origen inmunológico (característicos de la nefropatía por IgA, nefritis lúpica, síndrome de Goodpasture), de origen hemodinámico (como la hipertensión), por isquemia, tóxicos o infecciones bacterianas y/o víricas (2). Factores como la diabetes mellitus tipo 2, la obesidad y el envejecimiento de la población también contribuyen al deterioro renal (1), (3), (4), (5).

La enfermedad renal se caracteriza por una destrucción progresiva del parénquima renal y una pérdida de la funcionalidad de la nefrona (6). Aunque la pérdida de función renal puede resolverse de forma natural, también puede progresar hacia una cronificación en el tiempo, y dar lugar a la enfermedad renal terminal (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema representativo de la progresión del daño renal.

Otro problema en este campo, es que no existen biomarcadores selectivos para su uso en clínica, los cuales podrían dar información sobre la gravedad de los cambios histológicos y podrían predecir eficazmente la progresión de la ERC hacia la etapa terminal de la misma (7).

Los actuales tratamientos clínicos para la ERC sólo retardan la progresión de ésta enfermedad cuya consecuencia final es la pérdida funcional del tejido. A pesar de todo, algunas patologías como la nefropatía diabética o la nefropatía hipertensiva, han demostrado una mejor evolución gracias a algunos tratamientos como el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) o antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II), que bloquean el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAA), retrasando la progresión de la enfermedad (8), (9), (10).

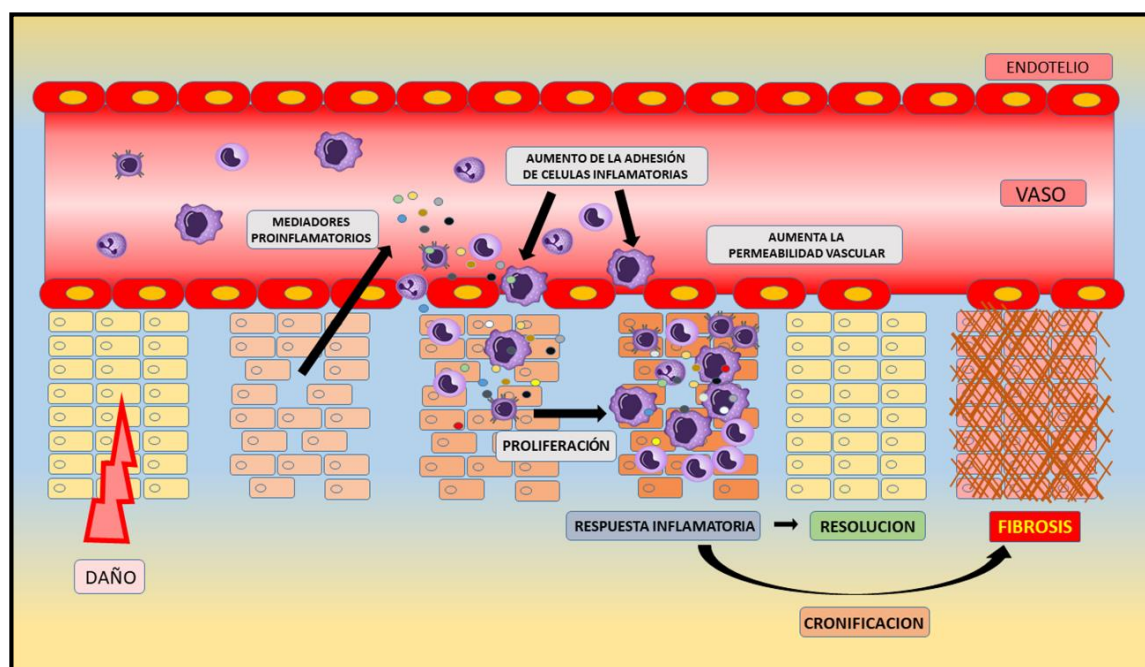
Actualmente uno de los mayores problemas clínicos es el aumento de pacientes que terminan desarrollando enfermedad renal terminal (11). Esta etapa de la enfermedad renal requiere, en todos los casos, una terapia renal de reemplazo como puede ser la diálisis (hemodiálisis/diálisis peritoneal) o el trasplante renal. Aproximadamente la mitad de los pacientes que se someten a diálisis, sólo permanecen un máximo de tres años con este tipo de terapias, de ahí la importancia del desarrollo de nuevas estrategias que sean capaces de restaurar la función del riñón o en su defecto, prevenir la progresión de la enfermedad renal (12).

## **2.- Mecanismos que se activan en el daño renal.**

### **2.1-Proceso inflamatorio.**

La inflamación es un proceso complejo que se produce en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos y no inmunológicos, cuya función es la reparación del daño y la restauración de la función normal del tejido con el menor daño tisular posible (13). La inflamación renal puede darse como consecuencia de un daño agudo, o como parte de un proceso global y sistémico, que por lo general, si no se resuelve, desemboca en un proceso fibrótico, caracterizado por fibrosis tubulointersticial, atrofia tubular y esclerosis glomerular (14). La respuesta inflamatoria comienza con un aumento del flujo sanguíneo y un ensanchamiento del vaso, así como un incremento de la permeabilidad vascular y un creciente reclutamiento de células inflamatorias cerca del tejido dañado (15). El proceso por el cual las células inflamatorias se adhieren al vaso, está regulado por multitud de mediadores pro-inflamatorios como selectinas, moléculas de adhesión, integrinas y quimioquinas, que controlan la llegada y la posterior integración en el tejido de las diferentes células del sistema inmune encargadas de la reparación del daño (16) (Figura 2). En un ambiente pro-inflamatorio, las células residentes del riñón comienzan a secretar citoquinas inflamatorias, (IL6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TWEAK), quimioquinas (CCL2, CCL5, OPN), moléculas de adhesión (ICAM-1), factores de crecimiento (CTGF,

TGF- $\beta$ , EGF, PDGF, PTHrP) y péptidos vasoactivos (Ang II, ET-1) (17), (18). Este proceso de daño renal da lugar a la activación de diferentes vías de señalización como la ruta de NF- $\kappa$ B o la de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que regula la transcripción de genes implicados en la inflamación (19), (20), (21), (22).



**Figura 2.** Representación esquemática del proceso inflamatorio y su evolución hacia la fibrosis o hacia la resolución del daño.

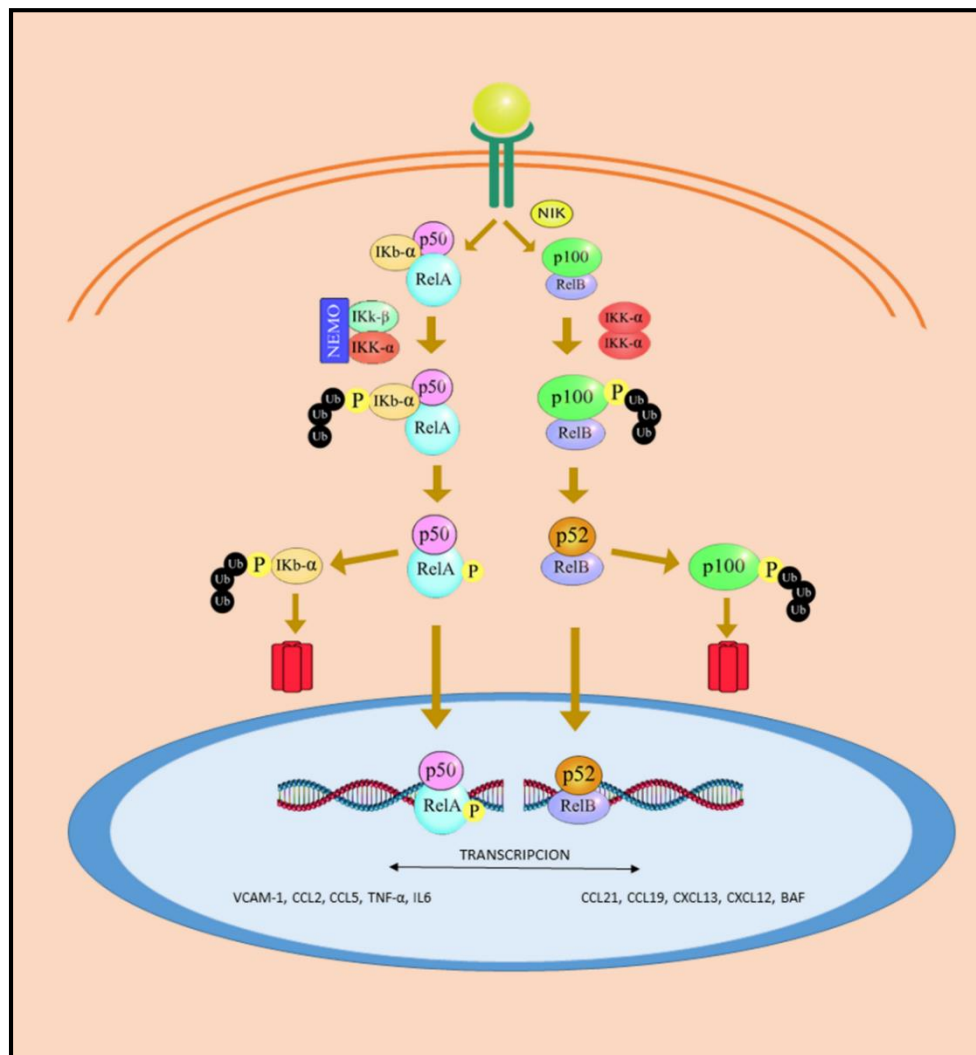
## 2.2- Vía de señalización del factor nuclear - $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

El factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), es un factor de transcripción que regula diferentes procesos celulares como la inflamación, la inmunidad, la apoptosis o la proliferación celular (23). NF- $\kappa$ B está implicado en la transcripción de una gran cantidad de genes, tanto de respuesta temprana como tardía. También está implicado en la expresión de proteínas características de la propia vía como I $\kappa$ B $\alpha$  o I $\kappa$ B $\epsilon$ , e igualmente es el responsable de la expresión de citoquinas inflamatorias como IL6, IL8 o IP-10, moléculas de adhesión o moléculas quimioatrayentes como CCL5 y CCL2 (19). Hay muchos estímulos que activan NF- $\kappa$ B como pueden ser citoquinas, factores de crecimiento, patógenos, mediadores inmunes, proteinuria o estrés metabólico (22). También responde ante una gran variedad de estímulos como por ejemplo, productos virales o bacterianos, factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Ang II, estrés intracelular y extracelular, estrés metabólico como altas concentraciones de glucosa y productos de glicosilación avanzada (24), (25), (26).

## INTRODUCCIÓN

Existen 5 miembros de la familia de NF- $\kappa$ B, RelA/p65, RelB, cRel/Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50; generado a partir de p105) y NF- $\kappa$ B2 (p52; generado a partir de p100), que pueden establecer potencialmente 15 homo/heterodímeros (27). Las proteínas de la familia de NF- $\kappa$ B tienen en común una región de homología Rel, también llamada DHR, localizada en el extremo N-terminal de la proteína, de unos 300 aminoácidos, que posee dominios de unión al ADN y es responsable de su dimerización, de su interacción con las I $\kappa$ Bs y de su localización nuclear. Además, la región DHR contiene una señal de localización nuclear (SLN) que facilita la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo. Los dímeros de NF- $\kappa$ B se unen al promotor de gran variedad de genes a través de sitios  $\kappa$ B que poseen en su secuencia (27). En condiciones normales, los dímeros de NF- $\kappa$ B se encuentran en el citoplasma unidos a una subunidad inhibidora llamada I $\kappa$ B. Esta familia está compuesta por las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\delta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  y Bcl-3. Las I $\kappa$ B contienen entre cinco y siete repeticiones conservadas de tipo anquirina, que son fundamentales para su unión a NF- $\kappa$ B a través de los dominios DHR. De este modo, el represor o la subunidad inhibitoria enmascaran la SLN e impiden su translocación al núcleo. Las proteínas I $\kappa$ B tienen la capacidad de desestabilizar la proteína por su extremo c-terminal, lo que lleva a su degradación (28), (26). El dímero más abundante en la mayoría de los tipos celulares y por lo tanto el más estudiado, es el formado por las subunidades p65/p50, que está predominantemente unido a la proteína inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ . La activación de la vía canónica del NF- $\kappa$ B involucra la activación de las quinasas IKKs (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y la subunidad reguladora NEMO) que inducen la fosforilación de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B (principalmente de I $\kappa$ B $\alpha$ ) en los residuos de Ser32 y Ser36, que marcan a esta proteína para ser reconocida por el complejo ligasa-ubiquitina (29), (30). Esta enzima poliubiquitina a I $\kappa$ B en los residuos de Lys21 y Lys22, lo cual provoca su degradación por el proteasoma 26S. Este proceso permite el desenmascaramiento de la SLN de NF- $\kappa$ B y la fosforilación de la subunidad p65 en el residuo Ser 536 por las proteínas IKKs, dando lugar a su translocación al núcleo, activando con ello la transcripción de genes diana debido a su unión a los elementos de alta afinidad - $\kappa$ B en sus promotores y la formación de complejos con varios coactivadores (26), (30), (27). Entre los genes que regula NF- $\kappa$ B por la vía canónica se encuentran genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria como VCAM-1, CCL2, CCL5, TNF- $\alpha$  e IL6, en el remodelado tisular como las metaloproteinasas de matriz (MMPs), y enzimas como la fosfolipasa 2A y ciclooxigenasas (8), (31), (32), (33), (20), (19).

La vía no canónica de activación de NF- $\kappa$ B, es una vía de respuesta más tardía. Este proceso alternativo comienza con la activación de la quinasa NIK, junto con el reclutamiento de IKK $\alpha$  que forma el complejo dimérico IKK $\alpha$ /IKK $\alpha$  que, al fosforilarse, causa la degradación, a través del proteasoma, de la subunidad p100 perteneciente al complejo NF- $\kappa$ B2, formando p100/p52 (26). Esta degradación permite la formación de los complejos RelB/p52, que posteriormente viaja al núcleo para activar la transcripción de genes característicos de esta vía no clásica. La activación de esta vía permite la transcripción de un grupo de genes distintos a los regulados a través de la vía clásica, entre los que se encuentran quimioquinas como CCL21, CCL19, CXCL13 o BAF (34) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B. En él se puede ver cómo las dos vías de señalización conocidas, tanto la clásica o canónica como la no canónica, desembocan en la expresión de genes característicos de cada vía.

### 2.3- Respuesta inmune.

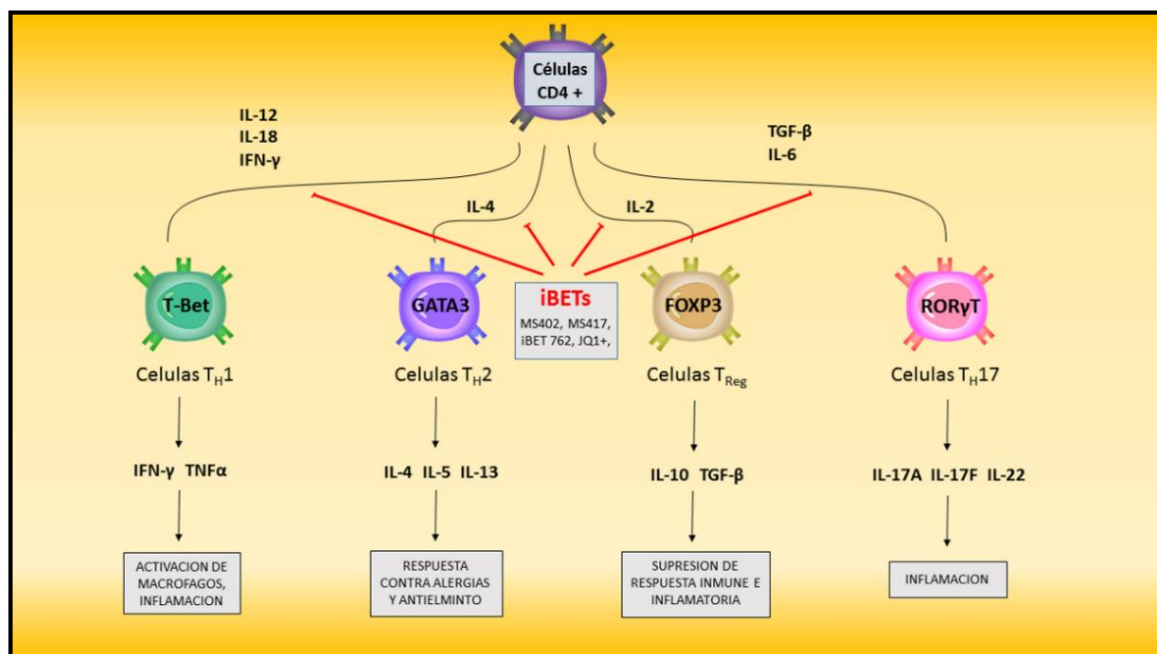
En la respuesta inflamatoria es muy importante tanto la inmunidad innata como la adaptativa. La inmunidad innata se activa en estadios muy tempranos del proceso inflamatorio y es una respuesta que no depende específicamente de los antígenos presentes en el medio. Sus células efectoras más importantes son neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, natural killer y células T. La respuesta inmune adaptativa es más sensible a la exposición de antígenos específicos que son presentados tanto por los patógenos como por las propias células del sistema inmune. Dentro de esta respuesta adaptativa se incluyen procesos como la maduración de células dendríticas y la presentación de antígenos, la activación y proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (linfocitos T citotóxicos) y la interacción entre ellos. Los leucocitos, las células dendríticas y los macrófagos juegan un papel importante en ambos tipos de inmunidad mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias y presentadoras de antígenos a los linfocitos. Los linfocitos Th tienen un papel central en la regulación de la respuesta inmune adaptativa (35).

#### 2.3.1- Respuesta Th17.

La diferenciación de linfocitos Th CD4<sup>+</sup> a los diferentes subtipos, depende de complejos mecanismos regulados específicamente por la activación dependiente de citoquinas características y factores de transcripción propios de cada tipo celular. En condiciones normales, la activación de las células Th CD4<sup>+</sup> es fundamental para el control de la respuesta inmune, y una desregulación de la activación de estas células, puede dar lugar a enfermedades autoinmunes (35). Ante la presencia de células presentadoras de antígeno, los linfocitos Th CD4<sup>+</sup> se activan dando lugar a diferentes subtipos de linfocitos Th maduros como son los Th1, Th2, Treg o Th17 (Figura 4). El hecho de que las células Th CD4<sup>+</sup> se puedan diferenciar a varios subtipos de Th maduros activando diferentes vías efectoras, explica que exista un complejo mecanismo de regulación de la respuesta inmune (36), (37), (38).

La diferenciación específica de linfocitos CD4<sup>+</sup> hasta células Th17 es un proceso complejo en el que están involucrados multitud de factores clave como el activador de la transcripción 3 (STAT3) (39), (40), (41). La bioquímica de la ruta de señalización JAK / STAT se ha estudiado ampliamente (42). El primer paso en la activación de la vía es la inducción de un cambio conformacional del receptor tras la unión del ligando correspondiente, cuyas regiones citoplasmáticas están acopladas a moléculas de señalización. El siguiente paso es la activación de las proteínas JAK asociadas al receptor. Una vez activadas son capaces de fosforilar en residuos de tirosina a las cadenas de dicho receptor, creando sitios de unión para las proteínas STAT.

Estas proteínas STAT son reclutadas para que, a su vez, sean fosforiladas por las proteínas JAK. Las proteínas STAT se dimerizan y se translocan al núcleo para la expresión de genes propios de esta vía de señalización (43). Las células Th17 producen citoquinas de la familia IL-17 (IL-17A-F) siendo IL-17A su principal molécula efectora (44). La diferenciación hacia células Th17 se produce en presencia de IL6, que induce la expresión del factor de transcripción de tipo huérfano del receptor de ácido retinoico gamma t (ROR $\gamma$ t) a través de la activación de STAT 3 (45). Las células Th17 también sintetizan IL21 e IL23, citoquinas que son necesarias para el mantenimiento y progresión de ésta respuesta a través de la vía de señalización de STAT 3 (44), (46), (47). La respuesta Th17 está implicada en la protección del organismo frente a patógenos extracelulares, como ocurre con las células Th1, pero también se ha relacionado a las células Th17 con procesos de inflamación crónica (45), (48), (49), (50).



**Figura 4.** Representación esquemática de la diferenciación de las células Th CD4<sup>+</sup> a los diferentes subtipos de Th maduros.



### 2.4- Proceso fibrótico.

La presencia de estímulos dañinos de forma crónica causa la alteración del proceso normal de reparación y desemboca en una acumulación de proteínas de matriz extracelular (MEC), principalmente de componentes como Fibronectina y Colágeno I, III y IV, lo cual da lugar a fibrosis (51). El proceso de fibrogénesis renal está mediado por células tubuloepiteliales, por células infiltrantes del sistema inmune y por fibroblastos intersticiales, siendo éstos últimos las células que sintetizan la mayor parte de la matriz extracelular (52). Este proceso comienza con la fase inflamatoria, iniciándose con la activación de las células tubuloepiteliales o de las células mononucleares infiltrantes que producen un incremento en el número de miofibroblastos intersticiales, lo cual lleva a un aumento en el depósito de componentes de la matriz extracelular (proceso reversible y similar a la cicatrización de una herida). En condiciones patológicas, tanto las células tubuloepiteliales como las células endoteliales, pueden sufrir transición epitelio/mesénquima (TEM), convirtiéndose en miofibroblastos productores de matriz y contribuyendo a la fibrosis renal y a la progresión de la enfermedad (53). En este proceso participan diversos factores, entre los que destacan TGF- $\beta$ , CTGF, FGF, IL-1 $\beta$ , AGES y Ang II (54), (55), (56), (51).

Uno de los mediadores clásicos considerados como claves en el proceso fibrótico es el TGF- $\beta$ . Este mediador se expresa en tres isoformas diferentes TGF- $\beta$ 1, 2 y 3, siendo TGF- $\beta$ 1 la isoforma más abundante. La forma activa TGF- $\beta$ 1 se une a T $\beta$ RII (Type II TGF- $\beta$  receptor), una quinasa constitutivamente activa que recluta T $\beta$ RI (Type I TGF- $\beta$  receptor), y que fosforila a su vez a los receptores asociados a las proteínas SMAD (R-SMAD), SMAD2 y SMAD3 (57). Las formas fosforiladas de SMAD2 y SMAD3 se unen a la forma más común, SMAD4, para translocarse al núcleo y regular la transcripción de diferentes genes con la ayuda de diferentes coactivadores y represores. Existe una subunidad inhibitoria de la ruta, SMAD7, que compite de forma activa con R-SMAD por unirse a los receptores activos (58). Existen publicaciones que demuestran que TGF- $\beta$ 1 es un mediador importante en la ERC asociada a fibrosis renal progresiva que además posee múltiples propiedades biológicas entre las que se incluyen proliferación celular, diferenciación, apoptosis, autofagia y producción de matriz extracelular (59). Evidencias considerables han revelado que TGF- $\beta$ 1 es sustancialmente regulado tanto en los riñones dañados en pacientes con ERC como en diferentes modelos de daño renal experimental (60), (61).



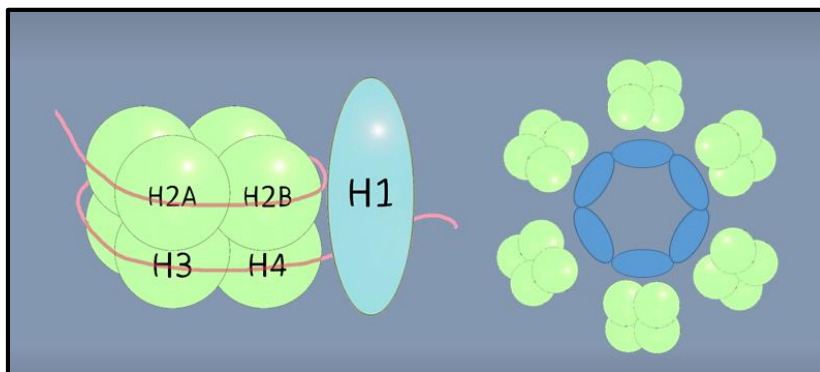
#### 2.4.1- El factor de transcripción SOX9.

Los genes SOX son reguladores del desarrollo caracterizados por la presencia de un dominio de unión al ADN de alta movilidad con una marcada homología con el gen SRY determinante del sexo. La familia de genes SOX puede subdividirse en doce subgrupos definidos por homologías adicionales fuera del dominio de unión al ADN (62). El subgrupo E de genes SOX consta de tres miembros: SOX8, SOX9 y SOX10. El gen estudiado con mayor detalle en este subgrupo es SOX9. Mutaciones heterocigóticas en este gen causan displasia campomélica en los seres humanos, síndrome caracterizado por un desarrollo óseo anormal, letalidad perinatal y otras anomalías (62). En el desarrollo embrionario, así como en órganos adultos, SOX9 tiene un papel importante en la regulación de la expresión de proteínas de matriz y se encuentra asociado con patologías fibróticas que afectan a la piel, hígado y corazón (63), (64), (64). En modelos murinos de fibrosis hepática, la activación de SOX9 es responsable de la producción de Colágeno tipo I en células estrelladas hepáticas (64). SOX9 es una proteína perteneciente a la familia de factores de transcripción involucrados en el desarrollo de diferentes órganos, resultando necesario en la diferenciación de condrocitos y en la expresión de genes específicos de cartílago, incluyendo los Colágenos de tipo II, IX y XI. En el riñón SOX9 se expresa en estadios tempranos de la formación del uréter manteniendo la integridad del mismo, y se ha observado que la deficiencia de SOX9 causa la formación ectópica de nefronas (65). En ratones, la supresión combinada de SOX8 y SOX9 produce hipoplasia renal grave (66). Estudios realizados en modelos de daño renal agudo han descrito que la activación de SOX9 precede a la expresión de biomarcadores de daño renal, como N-Gal y Kim1, indicando que podría tener papel muy temprano en el daño renal (67). En la fase aguda en un modelo de isquemia reperusión, la mayoría de las células en fase de proliferación fueron positivas para SOX9. Además, la delección de SOX9 en las células del túbulo proximal resultó en proliferación epitelial reducida, desembocando en una lesión más grave (68), (66). Sin embargo, su papel en la fibrosis renal no está bien establecido.

### 3.- Epigenética.

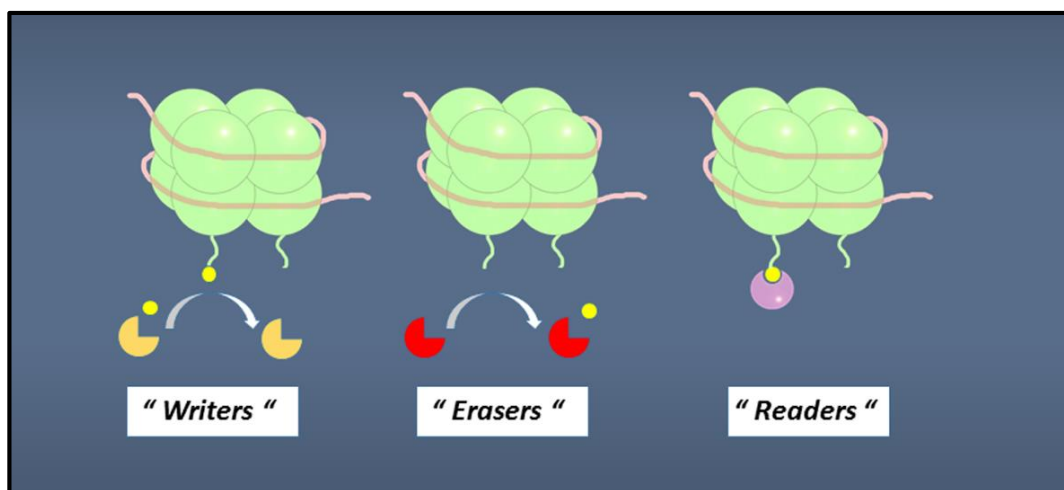
Conrad Hal Waddington introdujo el término epigenética a principios de los años cuarenta (69), y la definió como *"la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos, que llevan a un fenotipo observable"*. Más concretamente, esta definición se refiere a todas las vías moleculares que modulan la expresión de diferentes genes en un fenotipo particular (70). En los años siguientes, con el rápido crecimiento de la genética, el significado de este término ha ido cambiando gradualmente. En la actualidad la "Epigenética" describe el mecanismo por el cual los organismos multicelulares desarrollan múltiples tejidos diferentes a partir de un único genoma. Esta variabilidad es debido a diferencias en la actuación de la maquinaria transcripcional, afectando a la expresión de diferentes genes, lo cual conlleva una gran variedad de perfiles fenotípicos (71). Esta definición se basa en la existencia de cambios heredables en la estructura y organización del ADN, sin implicar cambios en la secuencia de nucleótidos, y que modulan la expresión de diferentes genes (71), (72), (73).

Un concepto clave en la epigenética es que la actividad transcripcional basal en eucariotas es esencialmente restrictiva, activándose únicamente en presencia de activadores que dan lugar a la formación de un complejo transcripcional y la posterior expresión de diferentes genes. El ADN no existe en la célula como una molécula desnuda. Un metro de ADN genómico tiene que ser compactado en el núcleo, el cual es un orgánulo de aproximadamente seis micras de diámetro (74). Este notable grado de compactación, que se observa en todas las células eucariotas, está mediado por un conjunto de proteínas asociadas con el genoma, formando una estructura de nucleoproteínas conocida como cromatina. La unidad básica de repetición de la cromatina es el nucleosoma, que consta de aproximadamente de 146 pares de bases de ADN envolviendo a un complejo de proteínas dispuestas en forma de octámero, compuesto de cuatro núcleos de histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas son proteínas que interaccionan con la carga negativa del ADN a través de sus residuos cargados positivamente (75) (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura del octámero de histonas y su disposición para formar la cromatina.

La cromatina puede asumir una conformación compacta (HETEROCROMATINA), donde la expresión génica no se puede llevar a cabo, y otra estructura más abierta (EUCROMATINA), en la cual el ADN es accesible para la maquinaria transcripcional (76). En los últimos años se ha demostrado la gran importancia que tienen los mecanismos que regulan la actividad de la cromatina a través de las modificaciones epigenéticas. Los mecanismos tradicionales de regulación epigenética incluyen multitud de modificaciones como la metilación del ADN o modificaciones de histonas, siendo estas últimas, claves para la formación del complejo transcripcional (77), (78). La mayor parte de las modificaciones químicas que ocurren en las histonas se producen en los aminoácidos localizados en sus colas. Las diferentes proteínas encargadas de realizar las distintas modificaciones epigenéticas, se clasifican generalmente en 3 grupos (Figura 6): las “writers” o escritoras que son proteínas encargadas de añadir (“escribir”) las diferentes marcas epigenéticas. Un ejemplo de estas enzimas son las *HAT* (histona acetil transferasas), que añaden grupos acetilos a las colas de las histonas. También existen las enzimas eliminadoras o “erasers” encargadas de “borrar” las marcas epigenéticas de las histonas. Un ejemplo de éstas últimas son las *HDAC* (histona deacetilasa) que se encargan de quitar los grupos acetilo de las lisinas. Por último, existen proteínas lectoras o “readers”, cuya función es reconocer las diferentes marcas epigenéticas añadidas en las histonas. Entre las proteínas “readers”, están las proteínas BET, que contienen bromodominios, las cuales reconocen residuos de lisinas acetiladas en las colas de las histonas (Figura 6) (79), (80).

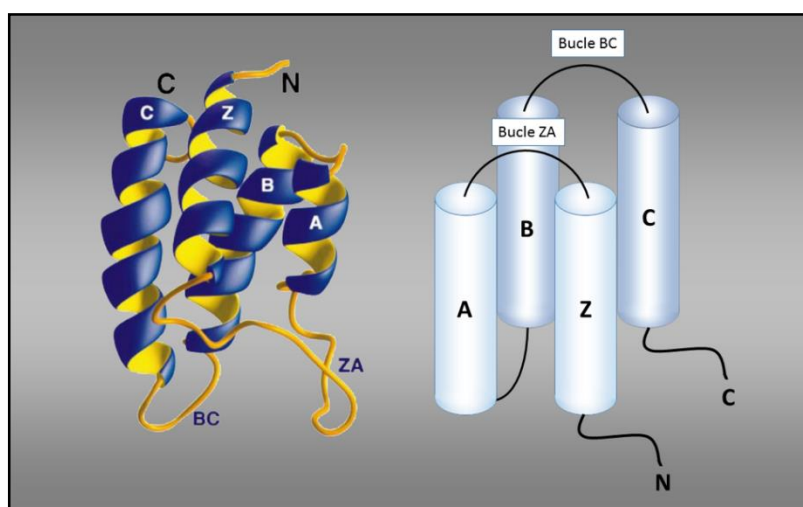


**Figura 6.** Diferentes proteínas que añaden, eliminan y reconocen distintas modificaciones epigenéticas.

Las modificaciones post-trasccripcionales de las histonas (PTMs), que modifican la estructura de la cromatina, presentan una gran relevancia en el campo de la epigenética. Se han estudiado y descubierto multitud de estas modificaciones, de las cuales las más importantes son: la acetilación, metilación, ubiquitinación, propionilación y crotonilación de residuos de lisinas; metilación, ribosilación y citrulinación de residuos de arginina; y la fosforilación y glicosilación de serinas y treoninas (79). Estas modificaciones pueden ocurrir dentro del dominio plegado de las histonas o en los dominios N- y C-terminales que se extienden más allá del nucleosoma (81), (82).

### 3.1- Las proteínas BET (Bromodomain and extra-terminal proteins).

La familia de proteínas que poseen bromodominios en su extremo terminal (BET) está formada por cuatro miembros, BRD2, BRD3 y BRD4, que se expresan de forma ubicua, y BRDT, cuya expresión se limita a la célula germinal masculina. Las diferencias funcionales entre BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT aún no están bien definidas (83), (84). Las proteínas BET se localizan en el núcleo de la célula, cada una de las cuales contiene un tándem de dos bromodominios, en cuyo interior existe una secuencia de aminoácidos conservada que actúa como una señal de localización de histonas diacetiladas (H4K5acK12ac) (85). Los bromodominios fueron descritos por primera vez en estudios sobre el gen *Brama* en *Drosophila* (86), (87), y ahora sabemos que existen al menos 61 tipos de bromodominios codificados en el genoma humano. La estructura de los bromodominios está formada por 4 hélices empaquetadas con dos bucles de distinta longitud entre sus hélices, BC y ZA. El bolsillo hidrofóbico formado por los bucles BC y ZA está revestido por residuos de Tyr<sup>97</sup>, Asp<sup>140</sup>, Val<sup>152</sup>, Ala<sup>157</sup>, Tyr<sup>160</sup>, Val<sup>163</sup>, Tyr<sup>802</sup> y Tyr<sup>809</sup>. Dicho bolsillo hidrofóbico es un lugar idóneo para las interacciones proteína-proteína. Está situado en un extremo del paquete de cuatro hélices, opuesto a la zona amino y carboxilo terminal de la proteína (Figura 7) (88).



**Figura 7.** Imagen tomada de (89), donde se muestra la estructura de un bromodominio.

Los bromodominios sirven como reguladores de la interacción proteína-proteína en diferentes procesos celulares como la transcripción y el remodelado de la cromatina (90). Además, no están únicamente presentes en proteínas “lectoras”, encargadas de reconocer diferentes modificaciones epigenéticas (85), sino que también están presentes en 46 tipos diferentes de proteínas como acetil-transferasas, proteínas asociadas a cromatina, coactivadores transcripcionales o metil-trasferasas de histonas (89), (91), (92).

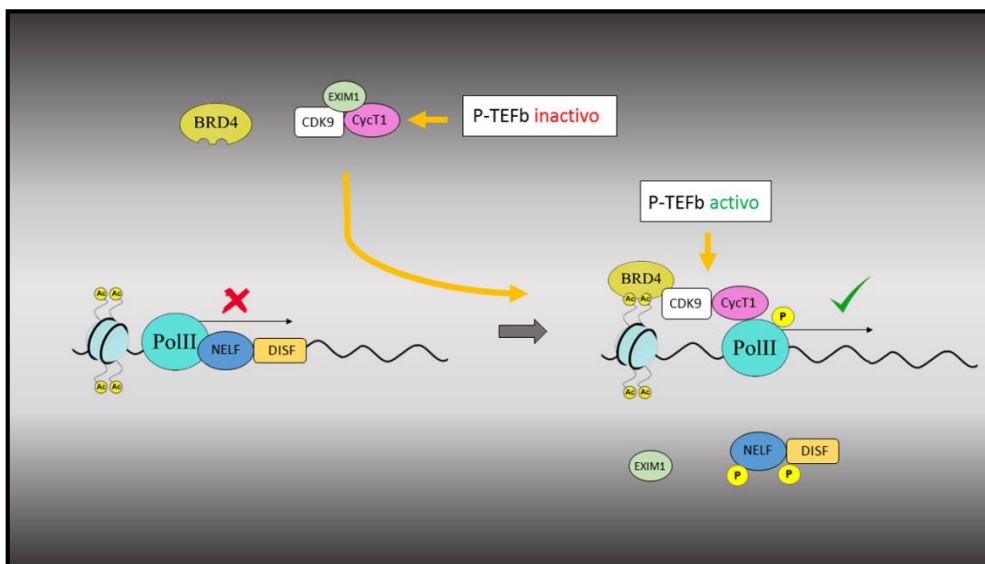
### 3.2- BRD4.

BRD4, es uno de los miembros de las proteínas BET mejor caracterizados, y originalmente fue denominada como proteína mitótica asociada a cromatina o MCAP. Fue identificada en 1988 en estudios sobre complejos mediadores en mamíferos como una proteína coactivadora que une factores de transcripción para la activación de la RNA Polimerasa II (Pol II) (93). Existen tres isoformas de diferente longitud: una isoforma más larga de 1362 aminoácidos y dos isoformas más cortas de 722 y 796 respectivamente (94).

BRD4 puede clasificarse como una proteína “lectora” de cromatina, ya que contiene dos bromodominios altamente conservados (BD1 y BD2) colocados en tándem, utilizados para mantenerse unido a la cromatina (95). BRD4-BD1 y BRD4-BD2 interactúan con cromatina acetiladas, así como con proteínas no histonas para regular la transcripción, replicación del ADN, progresión del ciclo celular y otras actividades celulares (95). BRD4 también puede ser clasificado como un coactivador transcripcional, ya que puede unirse directamente (o indirectamente) a factores de transcripción para promover efectos sobre la activación de la ARN Pol II (96). La mayor parte de la literatura sugiere que BRD4 funciona como una proteína de unión que vincula histonas acetiladas y factores de transcripción con el complejo transcripcional. Se ha descrito que BRD4 posee actividad quinasas y acetiltransferasa intrínseca, aunque no se sabe en qué medida afecta esta actividad a su función transcripcional (97). También se ha descrito que BRD4 está implicado en numerosos procesos celulares, incluyendo la regulación de la transcripción, la replicación y la reparación del ADN (95), (98). La disfunción en procesos epigenéticos como la acetilación de histonas y la metilación del ADN juegan un papel importante en muchas patologías humanas como el cáncer o las enfermedades inflamatorias. Existen inhibidores de proteínas “escritoras” y “eliminadoras”, que han sido recientemente aceptados por organismos como la agencia americana del medicamento (FDA) o están siendo probados actualmente en ensayos clínicos. En cambio, el desarrollo de inhibidores para las proteínas “lectoras”, ha comenzado en los últimos años (99), (100), (101).

### 3.3- Factor de elongación transcripcional positivo b (P-TEFb).

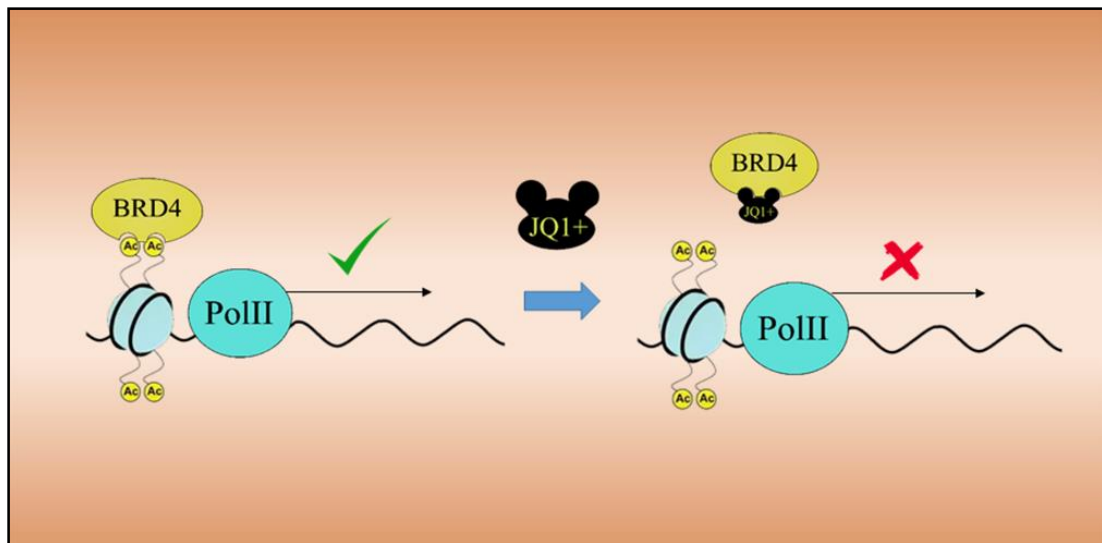
La transcripción en eucariotas está mediado por la ARN Pol II, y conlleva multitud de etapas coordinadas. Hoy en día existe mucha información acerca de cómo tiene lugar la iniciación de la transcripción, sin embargo, la fase de elongación es un paso decisivo para regular la expresión de multitud de genes inducibles (102), (103). Se ha demostrado la existencia de dos factores de elongación, uno positivo y otro negativo. El factor que posee la capacidad de promover la transcripción y la elongación fue denominado factor de elongación transcripcional positivo b (P-TEFb), y es un heterodimero con actividad quinasa compuesto por CDK9 y su ciclina, mayormente ciclina T1 y T2 (104). Los factores que desempeñan un rol negativo en la elongación fueron identificados como DSIF (compuesto por spt4 y spt5) y NELF (Factor negativo de elongación, compuesto por las subunidades NELF A, B, C/D, E) (105). Después de la iniciación de la transcripción, NELF y DSIF impiden la elongación, pausando la transcripción mediada por la Pol II. Se cree que esta pausa en la transcripción es un mecanismo de seguridad en la expresión temprana de gran cantidad de genes (106). Para que la transcripción continúe, es necesario el reclutamiento de P-TEFb a estas regiones promotoras, el cual fosforila y escinde tanto a NELF como a DSIF (102), (107). Existen evidencias que demuestran que BRD4, proteína que contiene bromodominios, tiene la capacidad de reclutar a P-TEFb para conseguir desbloquear la pausa de la Polimerasa II (108), (109) (Figura 8).



**Figura 8.** Representación esquemática de cómo BRD4 recluta al factor de elongación positivo b (P-TEFb), importante para la elongación y la progresión de la transcripción.

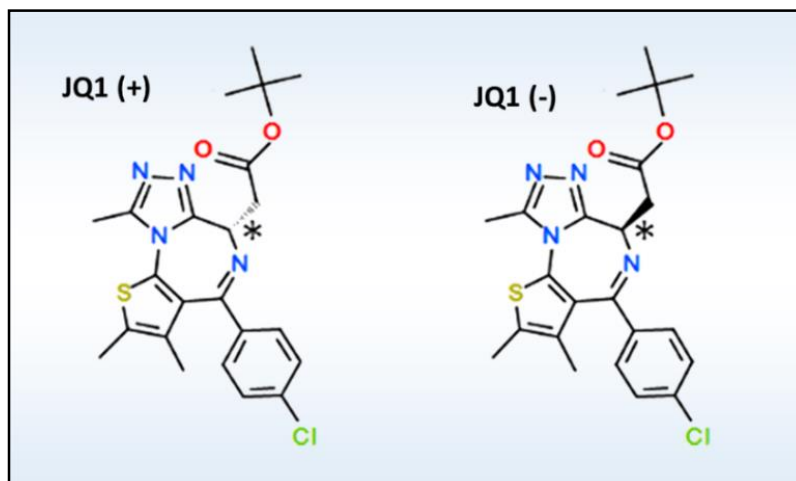
### 3.4- Inhibidores de proteínas BET. Descripción de JQ1.

La búsqueda de diferentes moléculas que ayuden al bloqueo de proteínas BET se está convirtiendo en un nuevo abordaje terapéutico en diferentes patologías. Existen muchos inhibidores de proteínas BET (iBET) que están dando resultados muy positivos en diferentes enfermedades. JQ1 es uno de los iBET más conocidos y participa en muchos procesos celulares involucrados en diferentes patologías. Este inhibidor se descubrió al estudiar un tipo de cáncer llamado carcinoma de la línea media de la proteína nuclear del testículo (NUT), originado por la translocación nuclear del producto del oncogén BRD4-NUT. El producto de este gen actúa bloqueando la diferenciación celular y manteniendo la célula en un estado permanente de proliferación (110). JQ1, llamado así porque fue desarrollado por Jun Qi, investigador perteneciente al grupo de Chris French, se une a los bromodominios de BRD4, impidiendo que esta proteína reconozca residuos de lisinas acetiladas localizados en las histonas (111) (Figura 9). Aunque sus primeros estudios fueron en patologías proliferativas como el cáncer, posteriores estudios han demostrado que JQ1 influye también en procesos como la apoptosis en células procedentes de cáncer de glándula parotídea, reduciendo la expresión de c-Myc y bcl-2, dos genes diana de BRD4 (112).



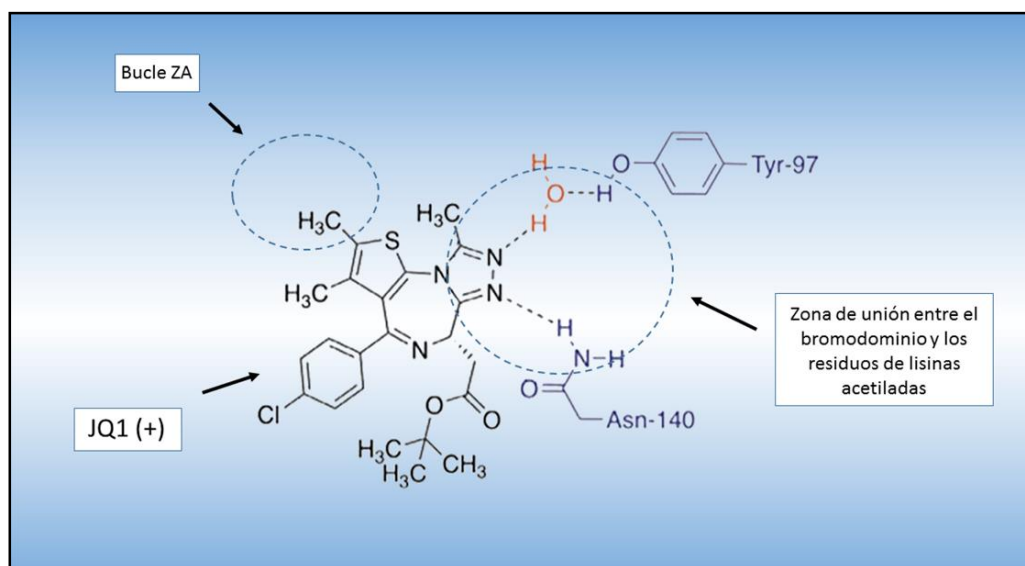
**Figura 9.** Representación esquemática del mecanismo de acción de JQ1.

El compuesto JQ1 es una tieno-triazolo-1,4-diazepina sustituida en la posición C-6 por el grupo funcional carboxilato de terbutilo, permitiendo una fácil modificación. Este agrupamiento disminuye el reconocimiento y el correspondiente enlace a los receptores de benzodiazepina del sistema nervioso central, siendo responsable además de su corta vida media (Figura 10).



**Figura 10.** Estructura química del inhibidor de proteínas BET, JQ1 (+), y de su enantiomero sin ninguna actividad biológica JQ1 (-).

La unión de JQ1 a BRD4 se realiza a través del bolsillo hidrofóbico mediante el cual se une a residuos acetilados de Lisina. Los dos átomos de nitrógeno adyacentes del anillo 1,2,4-triazol mimetizan el grupo carboxamida y se unen a través de enlaces de hidrógeno al grupo  $\text{NH}_2$  de la asparagina 140 y al grupo hidroxilo de la tirosina 97, en este caso a través de una molécula de agua, mientras que el sustituyente metilo del anillo de triazol se enlaza al lugar que ocupa el grupo metilo del acetilo (113), (114) (Figura 11).



**Figura 11.** Representación esquemática de la unión de JQ1 a BRD4.



Existen a día de hoy una gran batería de inhibidores de proteínas BET que están siendo usados en ensayos clínicos. ABBV-075 es un inhibidor de proteínas que contienen bromodominios con una potencial actividad antineoplásica. Este inhibidor se une a los bromodominios evitando de este modo la interacción entre las proteínas BET y las histonas acetiladas. Esto interrumpe la remodelación de la cromatina, impide la expresión de ciertos genes que promueven el crecimiento, y conduce a una inhibición del crecimiento celular en ciertos tumores (115). En estos momentos se están llevando a cabo ensayos clínicos en pacientes con diferentes tipos de cáncer, como cáncer de mama, cáncer microcítico de pulmón o cáncer de próstata. La compañía farmacéutica Roche actualmente realiza ensayos clínicos en pacientes con leucemia mieloide aguda, con un inhibidor llamado TEN-010. La compañía Resverlogix también desarrolla ensayos clínicos con su inhibidor RVX000222, con el propósito de determinar si el tratamiento con este inhibidor es favorable en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y con enfermedades cardiovasculares de alto riesgo (116).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

## **HIPÓTESIS.**

Estudios recientes han demostrado que factores como el estrés oxidativo, inflamación o toxinas urémicas pueden inducir cambios epigenéticos, modificando la expresión génica y contribuyendo al desarrollo de la fibrosis, enfermedades cardiovasculares o alterando la respuesta inmune en pacientes con enfermedad renal crónica. La identificación de estos cambios epigenéticos en la patología renal es aún un campo en vías de desarrollo, pero con grandes expectativas para definir nuevas dianas terapéuticas, ya que estos cambios epigenéticos son modificaciones potencialmente reversibles.

La familia de proteínas BET "*bromodomain and extra-terminal*", BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT, participan en el desarrollo de tumores, autoinmunidad, inflamación y fibrosis. Los bromodominios presentes en las proteínas BET, regulan la transcripción génica a través del reconocimiento específico de residuos de lisina acetilados presentes en histonas y otras proteínas nucleares.

La hipótesis de esta tesis es que moléculas inhibidoras de proteínas BET, como JQ1, que actúan bloqueando la unión de los bromodominios a proteínas acetiladas, podrían ser una novedosa diana terapéutica en patología renal, modulando cambios epigenéticos que regulan procesos claves en estas patologías, como son la inflamación y la fibrosis.

## OBJETIVOS.

**Objetivo general:** Investigaremos el papel de las proteínas BET en el daño renal experimental, con el fin de determinar si su inhibición podría ser una nueva diana terapéutica en patología renal.

**Objetivos concretos:**

- 1) Investigaremos el efecto de la inhibición de las proteínas BET, más concretamente BRD4, utilizando el inhibidor JQ1 o mediante silenciamiento génico de BRD4, en la regulación de genes proinflamatorios *in vitro*.
- 2) Evaluaremos el efecto de JQ1 en la regulación de la respuesta inflamatoria en varios modelos experimentales de daño renal de diferente etiología: **a)** modelo de obstrucción unilateral del uréter, caracterizado por daño tubulointersticial, **b)** modelo de administración sistémica de Angiotensina II asociado a aumento de la presión sanguínea e inflamación renal y **c)** modelo de daño por administración de suero nefrotóxico anti-membrana basal glomerular (NTS), caracterizado por inducción de glomerulonefritis inmune con formación de crescentes glomerulares. Además, se investigarán los mecanismos moleculares implicados en las acciones de JQ1.
- 3) Determinaremos el efecto de JQ1 en la fibrosis renal experimental y en la regulación de proteínas de matriz extracelular *in vitro*, investigando el papel potencial del factor de transcripción SOX9.
- 4) Comprobaremos si el tratamiento con JQ1 tiene efectos sobre la pérdida de función renal observada en modelos experimentales de daño renal.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

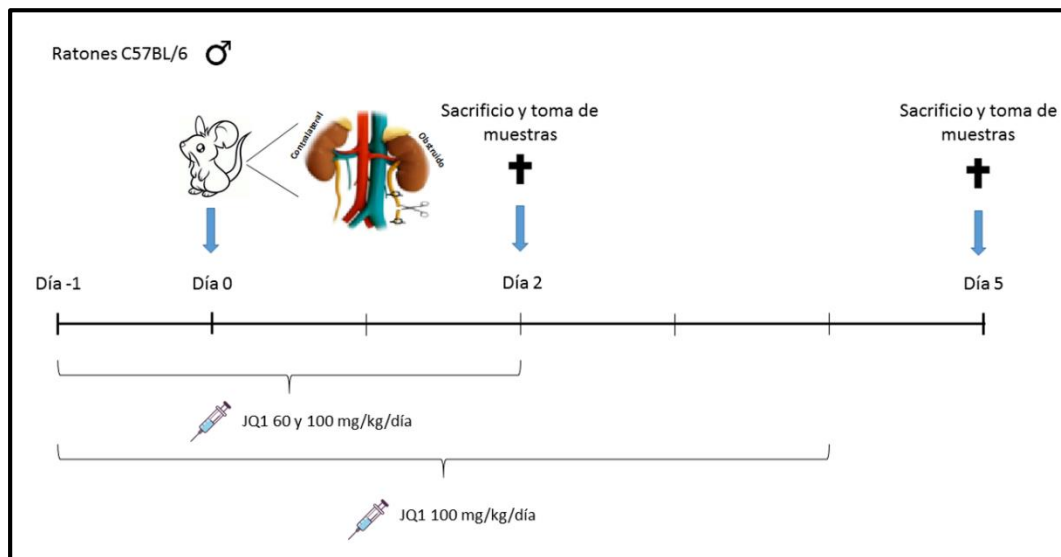
### **1.- Modelos experimentales.**

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices que regulan la investigación con animales de experimentación de la Comunidad Europea y con la aprobación previa del Comité de Ética de Investigación en Salud del IIS-Fundación Jiménez Díaz. Todos los ratones empleados en los estudios tenían entre 8 y 10 semanas de edad, un peso aproximado de 25 gr y pertenecían a la cepa C57BL/6 (Charles River, Barcelona, España).

En los modelos de daño renal desarrollados en esta tesis, el día del sacrificio se recogieron muestras de sangre y orina de cada animal para su posterior valoración. En el momento del sacrificio, los animales fueron anestesiados con 5 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer AG) y 35 mg/kg de ketamina (Ketolar, Pfizer). Tras el sacrificio, los ratones fueron perfundidos con salino frío por vía cardiaca y se extrajeron los riñones que se dividieron en varias secciones según la técnica de análisis a la que se destinara la muestra del tejido. Una sección del tejido, se fijó en una solución salina de formaldehído al 4%, y posteriormente el tejido se incluyó en parafina para el análisis inmunohistoquímico de la muestra. Otra sección se incluyó en medio de crio-preservación (OCT: Tissue-Tek), para estudios de inmunofluorescencia, y otra fue procesada para realizar estudios de inmunoprecipitación de cromatina, fijándola en una solución salina de formaldehído al 1% para su posterior inactivación con 0,125 M de glicina. Por último, el resto del riñón se congeló en nitrógeno líquido para los estudios de expresión génica y extracción de proteínas. El inhibidor de bromodominios BET, JQ1 fue cedido por el Dr. Bradner (Instituto Dana-Farber del Cáncer, Boston, USA). Para los estudios *in vivo*, JQ1, se resuspendió en 10 % hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina y se administró mediante inyección intraperitoneal a dosis de 60 y 100 mg/kg/día.

### 1.2.- Modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO).

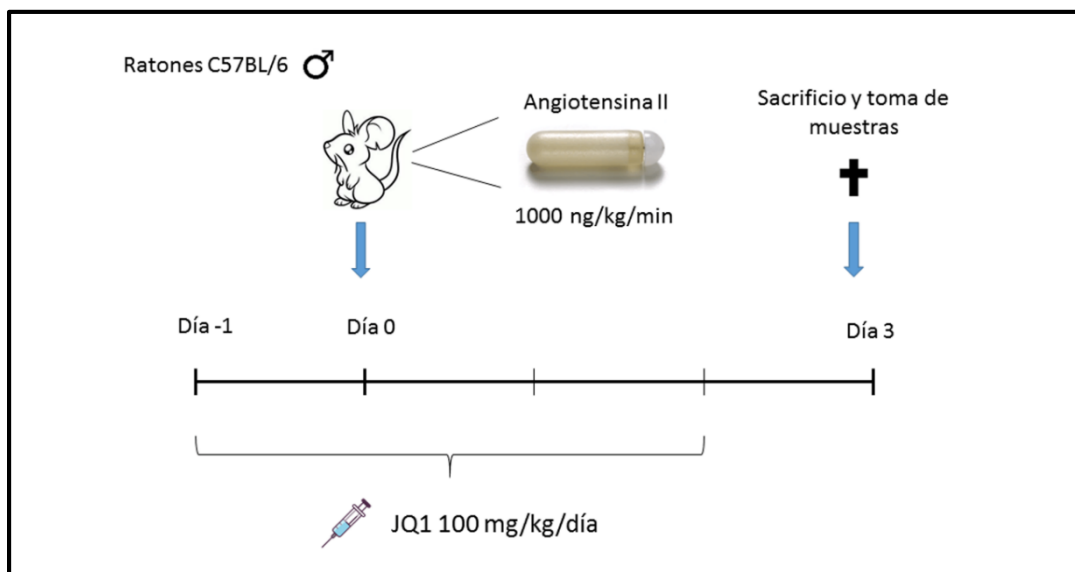
Para llevar a cabo los estudios de esta tesis se realizaron dos modelos de daño renal experimental con dos dosis distintas de JQ1 (100 y 60 mg/kg/día), y a dos tiempos diferentes (2 y 5 días). La cirugía se realizó bajo anestesia inhalatoria inducida por isoflurano. Para realizar la obstrucción del uréter izquierdo, se ligó con seda (5/0) en dos puntos del uréter y posteriormente se cortó entre las ligaduras para prevenir la infección del tracto urinario. Algunos animales fueron tratados con JQ1 mediante inyección intraperitoneal diaria comenzando 24 horas antes de la cirugía. El grupo control fue inyectado con el vehículo de resuspensión de JQ1, 10 % hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina. Todos los ratones fueron sacrificados 2 y 5 días después de la operación (n = 6-8 ratones por grupo). Los estudios compararon ambos riñones (contralateral vs obstruido) en cada ratón (**Figura 1**).



**Figura 1.** Representación esquemática de la línea temporal en el modelo de obstrucción unilateral del uréter.

### 1.3.- Modelo de infusión de Angiotensina II.

El modelo de infusión sistémica de Angiotensina II (Ang II) se realizó utilizando mini bombas osmóticas de infusión (ALZET micro-bombas osmóticas modelo 2001; Alza Corp. Palo Alto, CA, EE.UU.) que fueron colocadas, mediante cirugía, de forma subcutánea en la espalda del animal. Las mini bombas liberan una dosis de 1000 ng/kg/min de Ang II durante 3 días. Como control, se utilizó un grupo en el que las mini bombas sólo infundían solución salina. Algunos de los ratones fueron tratados con JQ1 a una dosis de 100 mg/kg/día intraperitoneal comenzando 24 horas antes de la implantación de las bombas (**Figura 2**).

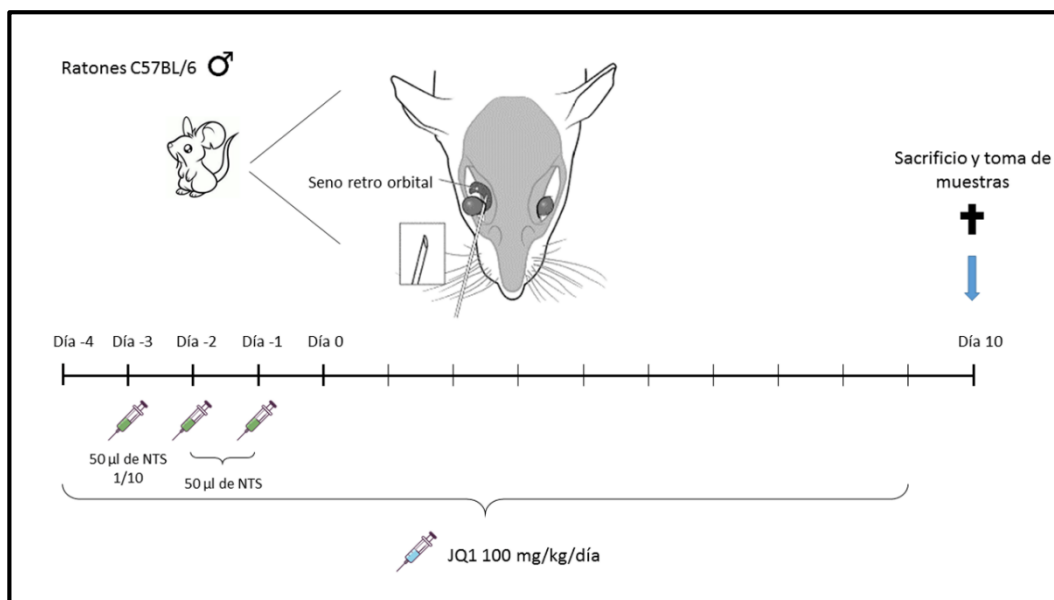


**Figura 2.** Representación esquemática de la línea temporal en el modelo de infusión de Angiotensina II.



#### 1.4.- Modelo de glomerulonefritis inmune.

La nefritis inmune se indujo en ratones administrándoles un suero que contiene anticuerpos frente a la membrana basal glomerular murina (GBM). Este suero se genera en conejos exponiéndoles a un extracto proteico de la membrana basal del glomérulo de ratón. Este modelo se asemeja a la glomerulonefritis anti membrana basal glomerular que ocurre en humanos (117). El suero fue inyectado en el seno retro orbital del ojo con un primer pinchazo de 50  $\mu$ l diluido 10 veces en una solución salina estéril. Seguidamente, en los dos días posteriores (día -2 y día -1), se realizaron sendos pinchazos del suero no diluido a una dosis de 4  $\mu$ L/g de peso corporal. Tras los pinchazos de suero, la nefritis se dejó progresar hasta los 10 días, momento en el cual los ratones fueron sacrificados. Los animales se dividieron en dos grupos, tratados y no tratados con JQ1, comenzando el tratamiento diario con el inhibidor, 24 horas antes de la inmunización con el suero NTS y prolongándose hasta los diez días (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de la línea temporal en el modelo de nefritis inmune producida por un suero contra la membrana basal glomerular (NTS).

## **2.- Estudios in vitro.**

### **2.1.- Cultivos celulares.**

#### **2.1.1- Células renales humanas del túbulo proximal (HK2):**

- Las células HK2 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) suplementado con un 10% de Suero Fetal Bovino de complementado (FBS, Sigma Aldrich), 100 U/ml Penicilina (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml Estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 2mM de L-Glutamina.

#### **2.1.2- Fibroblastos murinos (línea celular NIH/3T3, ATCC CRL-1658):**

- Los fibroblastos fueron cultivados en medio DMEM 4500 mg/L Glucosa suplementado con un 10% de FBS de complementado, 100 µg/ml Estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 2mM de L-Glutamina.

#### **2.1.3- Células mesangiales humanas (línea celular K18):**

- Estas células cedidas por la universidad de Salamanca, fueron cultivadas en medio DMEM 4500 mg/L Glucosa suplementado con un 10% de FBS de complementado, 100 µg/ml Estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 2mM de L-Glutamina.

Todas las líneas celulares utilizadas para los estudios *in vitro* se mantuvieron en medio libre de suero durante 24h antes de los experimentos.

### **2.2.- Tratamiento de los cultivos celulares con JQ1.**

Para realizar los estudios *in vitro*, JQ1, se disolvió en 10% de hidroxipropil β-ciclodextrina y se utilizó a unas dosis de 5 µM y 500 nM, al igual que el enantiomero JQ1 (-) utilizado como control ya que no posee actividad biológica. Los estudios *in vitro* fueron realizados en diferentes tipos celulares: En células renales humanas del túbulo proximal (línea celular HK2, ATCC CRL-2190), en fibroblastos y en células mesangiales de la cepa K18.

### **3.- Estudios de histología e inmunohistoquímica**

Las muestras murinas de tejido renal incluidas en parafina fueron cortadas con micrótomos en secciones de 2-4  $\mu\text{m}$  y montadas en portaobjetos tratados con polilisina. Luego, se desparafinaron e hidrataron, y posteriormente se incluyeron en xilol y en un gradiente decreciente de alcohol etílico (100°, 96° y 70°).

#### **3.1.- Morfología Renal.**

Para evaluar la morfología renal se realizó la tinción Tricrómica de Masson según el protocolo establecido (Bio-Optical). A los cortes rehidratados se les añadió la solución de hematoxilina de Weigert durante 7 minutos. Posteriormente, los cortes se lavaron y luego se les añadió como mordiente, ácido pícrico durante 5 minutos. Tras lavar las muestras se añadió fucsina de Ponceau y ácido fosfomolibdico durante 2 minutos. Para finalizar se añadió el colorante verde luz durante 10 minutos. Se procedió a deshidratar los cortes, fijar en xilol y montar en DPX (Fisher).

#### **3.2.- Inmunohistoquímica.**

Para realizar los estudios de Inmunohistoquímica las secciones de 2  $\mu\text{m}$  se desparafinaron durante 24 horas a 60°C, se realizó el protocolo de recuperación antigénica utilizando el sistema PT Link (Dako Diagnostics) con tampón citrato sódico 10 mM usando pH 6 o pH 9, dependiendo de las condiciones del anticuerpo primario facilitadas por la casa comercial. La peroxidasa endógena se bloqueó incubando las muestras 15 minutos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%, y las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se bloquearon utilizando la solución TBS/BSA 4%-8% de suero perteneciente a la misma especie en la que se produjo el anticuerpo secundario. Posteriormente se incubó el tejido con el anticuerpo específico toda la noche a 4 °C (**Tabla 1**).

Antígeno	Dilución	Referencia	Casa comercial
<i>F 4/80 +</i>	1/50	MCA497	BioRad
<i>CD3+</i>	Ready to use	A0452	Dako
<i>CD4 +</i>	Ready to use	IS649	Dako
<i>MPO</i>	Ready to use	IS511	Dako
<i>Colágeno IV</i>	1/200	ab6586	Abcam
<i>WT1</i>	Ready to use	M3561	Dako
Ab Secundario	Dilución	Referencia	Casa comercial
Anti-mouse biotina	1/5000	AP-124B	Millipore
Anti-rabbit biotina	1/5000	AP-132B	Millipore

**Tabla 1:** Relación de anticuerpos primarios y secundarios que se han utilizado en técnicas de inmunohistoquímica.

Para verificar la especificidad de los anticuerpos, se repitió todo el proceso, omitiendo los anticuerpos primarios. Las áreas positivas teñidas se evaluaron en diez campos elegidos al azar (x200 aumentos) utilizando el software Image-Pro Plus. Los datos se expresaron como el área positiva teñida con respecto al área total.

### **3.3.- Inmunofluorescencia.**

A las secciones ya desparafinadas se les aplicó un protocolo de recuperación antigénica utilizando el sistema PT Link (Dako Diagnostics) con tampón citrato sódico 10 mM ajustado a pH9 o pH6, dependiendo de las especificaciones del anticuerpo en concreto. Para eliminar la autofluorescencia del tejido, se incubaron las muestras durante 30 minutos con Cloruro de Amonio (NH<sub>4</sub>Cl) 50 nM. Posteriormente se incubó el tejido con los anticuerpos primarios correspondientes, durante toda la noche a 4 °C (**Tabla 2**). Tras lavar el tejido con la solución PBS-T, se incubó con su anticuerpo secundario fluorescente (Alexa Fluor) específico a temperatura ambiente durante 1 hora y en oscuridad. Finalmente, y tras lavar el tejido para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, las muestras se marcaron con 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich) para teñir los núcleos y se montaron con Mowiol (Sigma-Aldrich) sobre cubreobjetos de cristal. La fluorescencia se detectó mediante microscopía confocal (Confocal System TCS SP5, Leica).

Antígeno	Dilución	Referencia	Casa comercial
SOX9	1/200	AB5535	Milipore
$\alpha$ -SMA-FitC	1:300	F3777	Sigma-Aldrich
Colágeno IV	1/200	ab6586	Abcam
IL-17A	1/250	ab136668	Abcam
Antígeno	Dilución	Referencia	Casa comercial
AlexaFluor® 488	1/250	A21202	Life Technologies
AlexaFluor® 568	1/250	A11011	Life Technologies
AlexaFluor® 633	1/250	A2105	Life Technologies

**Tabla 2:** Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para realizar técnicas de inmunofluorescencia.

### 3.4.- Inmunofluorescencia in vitro.

Una vez cultivadas las células en placas de 24 pocillos sobre discos de cristal, se retiró el medio y se realizaron varios lavados con PBS fijando las células con PFA 4%. Tras un lavado con PBS/Glicina 5%, se incubaron 15 minutos con Tritón X-100 al 0,2% (Sigma-Aldrich) para permeabilizar la membrana celular. Pasado este tiempo, se lavaron con PBS y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA 4%/8% de suero (de la especie de origen del anticuerpo secundario) en PBS para eliminar posibles uniones inespecíficas. Posteriormente, los discos se incubaron con el anticuerpo primario (**Tabla 2**) toda la noche a 4 °C en agitación suave. Tras varios lavados con PBS, los discos se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente (Alexa fluor) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. Los núcleos se contrastaron con 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich) y finalmente los discos de cristal, con las células adheridas, se montaron con Mowiol (Sigma-Aldrich) sobre portaobjetos. La fluorescencia se detectó mediante microscopía confocal (Confocal System TCS SP5, Leica).

#### 4.- Estudios de expresión génica.

La obtención del ARN mensajero del tejido renal congelado, se llevó a cabo mediante su pulverización en un troquel y su posterior resuspensión en un reactivo líquido específico para la extracción de ARN denominado Trizol (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. El ARN obtenido se cuantificó en un nanodrop (Implen Nanophotometer), y se utilizó para obtener ADN codificante (ADNc), mediante un Kit de alta capacidad de síntesis de ADNc (Applied). La expresión génica de los diferentes genes fueron analizados utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con el sistema de detección de secuencias Real-Time FAST PCR 7500 (Life Technologies).

Se realizó un estudio multiplex empleando cebadores de cada gen a estudiar y como control para normalizar los datos, se utilizó un cebador para el gen de la GAPDH. Todos los oligos y sondas fueron adquiridos en Applied Biosystems (**Tabla 3**). Todas las medidas fueron realizadas por duplicado, utilizando H<sub>2</sub>O como control negativo. El número de copias de ARNm se calculó usando el programa incluido en el instrumental a partir del valor Ct (ciclo umbral). Los resultados se normalizaron con sus correspondientes valores de GAPDH.

Gen	Sonda	Gen	Sonda
CCL2/Mcp1	Mm00441242_m1	cxcl10/IP10	Mm00445235_m1
CCL5/Rantes	Mm01302428_m1	Havcr1/kim1	Mm00506686_m1
IL6	Mm00446190_m1	Lcn2	Mm01324470_m1
ICAM-1	Mm00516023_m1	SOX9	Mm00448840_m1
Colágeno 1	Mm00483888_m1	GAPDH	Mm99999915_g1
Fn1	Mm01256744_m1		
PAI1/serpina	Mm00435858_m1		

**Tabla 3.** Relación de sondas empleadas en los experimentos de qPCR.

## 5.- Estudios de expresión proteica.

Las muestras de proteínas total de células tratadas o de tejido renal fueron extraídas usando un tampón de lisis (50 mmol/l de Tris-HCl, 150 mmol/l de NaCl, 2 mmol/l de EDTA, 2 mmol/l de EGTA, 0,2% de Triton X-100, 0,3% de IGEPAL, 10 µl/ml de cocktail inhibidor de proteinasas, 0,2 mmol/l de PMSF y 0,2 mmol/l de Ortovanadato). En el caso de necesitar extractos de proteínas específicos de núcleo y citosol se utilizó un kit de fraccionamiento nuclear y citosólico NE-PER (Pierce). Para determinar el contenido de proteína, se utilizó el método del ácido bicinonínico (BCA). La cantidad de proteína cargada en cada carril fue de 20 a 100 µg por carril. Las proteínas extraídas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida (8-12%) en condiciones reductoras. Una vez separadas en el gel, las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas durante una hora, para evitar uniones inespecíficas, utilizando leche desnatada en polvo (5 % en TBS-T), y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (**tabla 4**) a 4 °C durante toda la noche y en rotación constante.

Antígeno	Dilución	Referencia	C. Comercial	Antígeno	Dilución	Referencia	C. Comercial
N-Gal	1/250	Sc-50350	Santa Cruz	p-Smad3	1:300	F3777	S. Aldrich
p-p65	1:50	sc-372	Santa Cruz	Colágeno IV	1/5000	ab6586	abcam
p-IKB-α	1/500	Sc-8404	Santa Cruz	Histona H1	1/500	Sc-8030	Santa Cruz
Il17A	1/250	ab9565	Abcam	BRD4	1/2000	A301-985A	Bethyl
SOX9	1/500	AB5525	Millipore	α-tubulina	1:5000	T5168	S. Aldrich
Fibronectina	1/5000	A2033	Millipore	Gapdh	1:5000	CB1001	Millipore
Colageno I	1:5000	AB765P	Millipore	β-actina	1/10.000	A5441	S. Aldrich

**Tabla 4.** Relación de anticuerpos usados en técnica de detección de proteínas western blot

Al día siguiente, se lavaron tres veces en TBS-T en ciclos de 10 min. Por último, las membranas fueron incubadas durante una hora con el anticuerpo secundario correspondiente (Amersham) (**Tabla 5**).



Secundario	Dilucion	Referencia	C. Comercial
Anti-mouse HRP	1/5000	NA931V	Amersham
Anti-rabbit HRP	1/5000	NA934V	Amersham

**Tabla 5.** Relación de anticuerpos secundarios que se utilizaron para la detección de proteínas por western blot

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T en ciclos de 10 min. Las bandas de proteínas se detectaron por quimioluminiscencia usando el kit ECL (GE Healthcare) utilizando el sistema Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare).

### **5.1- ELISA**

La concentración la citoquina CCL2 en extractos de proteína total en el modelo de obstrucción unilateral del uréter, fue determinada mediante enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) según protocolo específico de la casa comercial (BD OptEIA de BD Bioscience y DuoSet de R&D Systems) empleando una curva estándar de las citoquinas recombinantes y el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) para la detección colorimétrica. La absorbancia se midió en un lector de placas de ELISA, expresando los valores en pg/ml. La prueba de ELISA se desarrolló según el protocolo específico de la casa comercial.

## 6.- Inmunoprecipitación de cromatina (CHIP).

### 6.1.- Estudios CHIP in vitro.

Esta técnica se realizó en células tubulopiteliales humanas de la línea HK2. Primeramente, se añadió un cocktail de inhibidores de proteasas para luego fijar la unión de proteínas al ADN mediante formaldehído al 1% (Sigma-Aldrich). Después de un periodo de agitación, se añadió Glicina a una concentración de 0.125 M seguido por enfriamiento rápido. Los fragmentos de ADN de 500 a 1000 pb de longitud se generaron por escisión de la cromatina en un Bioruptor (Diagenode). La cromatina procesada se incubó con anticuerpo BRD4 (Bethyl, A301-985A) o IgG de conejo normal (control negativo) (Upstate Biotechnologies Inc.) y se recuperó con proteína ADN A-agarosa / esperma de salmón (Upstate Biotechnologies Inc.). Después de la reversión, de la unión del anticuerpo y tratamiento con proteinasa K, se extrajo el ADN y se analizó mediante qPCR en tiempo real con cebadores específicos. El enriquecimiento relativo se calculó como el porcentaje de ADN de entrada para cada muestra, utilizando la fórmula:

$$\% \text{ INPUT} = 2^{\exp [(Ct (\text{UNBOUND}) - \log_2 (\text{Unbound dilution factor})) - Ct (\text{BOUND})]} \times 100$$

**INPUT:** cromatina total que se introduce en la columna del experimento.

**BOUND:** es la cromatina que se une con un anticuerpo determinado.

**UNBOUND:** es la cromatina que no se unió al anticuerpo después de hacer el CHIP.

### 6.2.- Estudios CHIP in vivo.

El ensayo de CHIP en muestras de riñón se llevaron a cabo utilizando el Kit <sup>™</sup> de alta celular # chip (Diagenode) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando primers específicos. Los resultados se muestran como el enriquecimiento de n veces de anticuerpo anti-BRD4 más de un anticuerpo de control negativo (IgG de conejo normal).

## **7.- Arrays de expresión génica en perfiles humanos.**

El RNA total fue aislado usando el Micro Kit RNA queous (Ambion), conforme las especificaciones del fabricante. La calidad y la cantidad del RNA fue valorada usando un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y un fluorometro Qubit 2.0 Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA), respectivamente. El RNA fue hibridado con Illumina Expression Array HumanHT-12, versión 3. Los datos fueron analizados usando el software “R” del proyecto bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) y Lumi. Los genes con un aumento de 1.5 y con una significancia de  $P < 0.05$  fueron considerados significativos de acuerdo con las especificaciones de Illumina. Para un análisis funcional de la expresión de los genes, usamos el DAVID Go Web-based tool. Los datos sin procesar fueron enviados a Omnibus con el número de acceso GSE71602.

## **8.- Estudios de Silenciamiento génico.**

### Silenciamiento en células HK2.

Células de la línea HK2 fueron transfectadas con un silenciador específico para BRD4 humano a una concentración de 40 nM, de un SmartPool de ARN pequeños de interferencia (siRNA) (Dharmacon EN-TARGETplus) usando el reactivo de transfección Dharma FECT 1 (Dharmacon). Como control, se utilizó un siRNA control no específico. Las células fueron incubadas en un medio libre de suero durante 48 h antes de la estimulación. La eficacia del silenciamiento de BRD4 fue validada por qPCR en tiempo real.

### Silenciamiento en células mesangiales K18.

El silenciamiento génico en células mesangiales se realizó usando un siRNA específico contra SOX9, o un siRNA control (Ambion). Antes de la transfección el medio de crecimiento de las células (DMEM al 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor), fue sustituido por medio OPTIMEM sin antibióticos ni aminoácidos esenciales. Las células subconfluentes se transfectaron durante 24 h con un silenciador específico para SOX9 (25 nM), usando el agente transfectante Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) a una concentración de 50 nM. Algunas de las células solo fueron tratadas con el agente de transfección (Lipofectamin RNAiMAX) o con un silenciador control de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras 24 horas de transfección las células se incubaron con medio DMEM al 10% de FBS de complementado durante 24h, seguido de 24h de incubación con en medio sin suero antes de los experimentos.

## **9.- El análisis estadístico.**

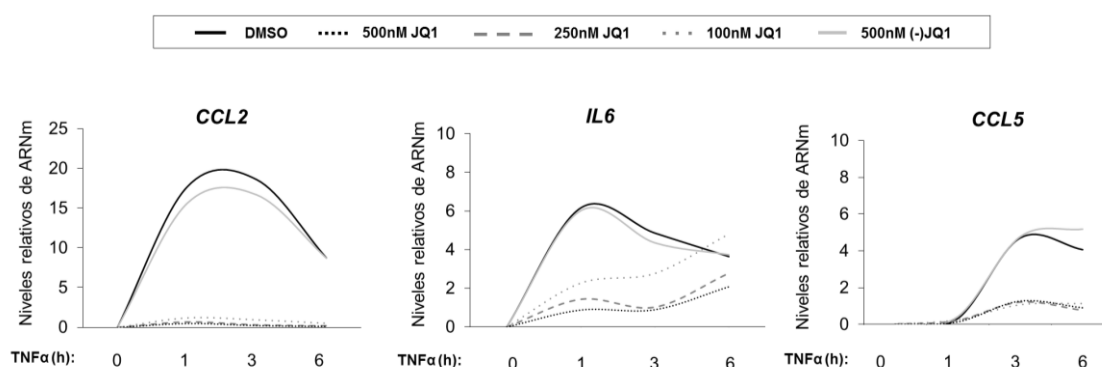
Los resultados se expresan mayoritariamente como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). En el modelo de UUO, se compararon los riñones obstruidos vs los riñones contralaterales para cada individuo. En el modelo de infusión de Ang II, se compararon los ratones control vs ratones infundidos sistémicamente con Ang II. En el caso del modelo de nefritis inmune por NTS, se compararon los ratones control vs los ratones tratados con el suero NTS. La media de los datos obtenidos de los riñones contralaterales o riñones no tratados, se tomaron como valores de referencia (control). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney o la t de student. Se estableció un valor máximo de probabilidad del 0,05 para ser estadísticamente significativo. Estos análisis se realizaron con el software estadístico SPSS versión 16.0 (Chicago, IL).

## **RESULTADOS**

## 1.- Efecto de la inhibición de proteínas BET en la respuesta inflamatoria renal experimental.

### 1.1.- El inhibidor de proteínas BET, JQ1, modula la expresión de genes pro-inflamatorios en células renales en cultivo.

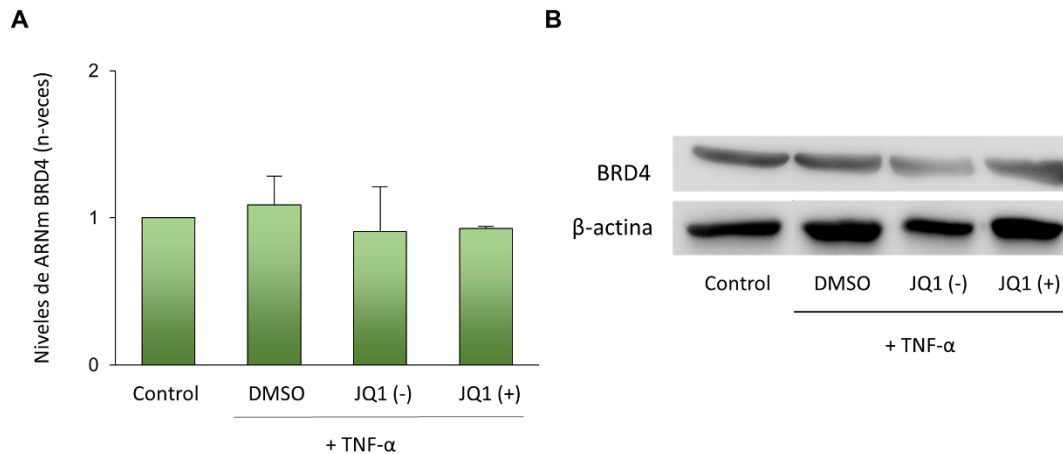
Con el fin de conocer si el inhibidor de proteínas BET, JQ1, era capaz de modular la respuesta inflamatoria en células renales, se realizaron estudios *in vitro* en células tubuloepteliales humanas en cultivo (línea celular HK2). Para ello, las células fueron tratadas con TNF- $\alpha$ , una citoquina que regula diversos genes y que participa en el proceso inflamatorio en enfermedades renales tanto humanas como experimentales (118). En células HK2, la estimulación con TNF- $\alpha$  aumentó la expresión génica de factores pro-inflamatorios como CCL2, CCL5 e IL6 a tiempos cortos (entre 1 y 6 horas). Por otro lado, la preincubación con el inhibidor de proteínas BET, JQ1 disminuyó la sobreexpresión de estos genes inducidos por TNF- $\alpha$  de forma dosis-dependiente (Figura 1).



**Figura 1. JQ1 regula la expresión de genes pro-inflamatorios en células renales en cultivo.** Las células tubuloepteliales humanas (línea celular HK2), se preincubaron con vehículo (DMSO) o con diferentes concentraciones del inhibidor de proteínas BET JQ1 (+) (100, 250 y 500 nM) o el control no activo JQ1 (-) (500 nM) durante 1 hora, y a continuación las células fueron estimuladas con TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) durante los tiempos indicados (entre 1 y 6 horas). Los niveles de expresión génica de CCL2, CCL5 e IL6 fueron analizados por qPCR en tiempo real. En las células tratadas con el vehículo, no hubo cambios en la expresión génica en comparación con las células no tratadas (considerados como control).

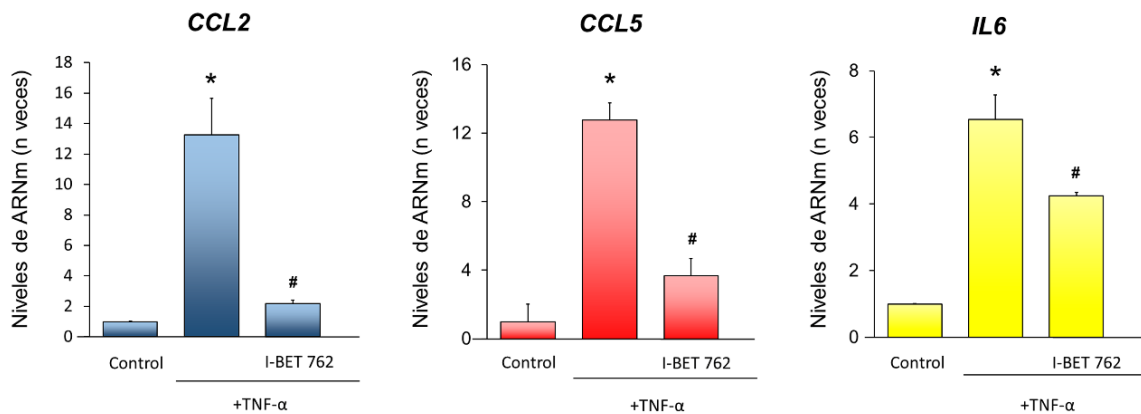
JQ1 es un inhibidor de proteínas BET, en particular de BRD4. Por ello se quiso estudiar a que nivel (expresión de mensajero, expresión proteica o funcionalidad), JQ1 ejercía sus efectos sobre BRD4. *In vitro*, tanto la expresión génica de BRD4 como sus niveles proteicos no se vieron alterados con el tratamiento con JQ1, lo que sugiere que la inhibición de las proteínas BET con JQ1, no afecta a los niveles proteicos ni a sus niveles de ARNm, sino a la funcionalidad de la proteína (Figura 2).

## RESULTADOS



**Figura 2. JQ1 no modificó los niveles de ARNm ni la expresión proteica de BRD4 en células renales en cultivo.** Las células tubuloepteliales (línea HK2), se preincubaron con el vehículo (DMSO), JQ1 (+) o el control no activo JQ1 (-) (ambos a 500 nM) durante 1 hora, y después se estimularon con TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) durante 3 horas **A**. Expresión génica de BRD4 que se determinó por qPCR en tiempo real. **B**. Los niveles proteicos de BRD4 se evaluaron mediante técnicas de western blot. Los datos representan los resultados observados en dos experimentos independientes. Para la normalización se utilizó **(A)** GAPDH y **(B)**  $\beta$ -actina como control de carga, respectivamente.

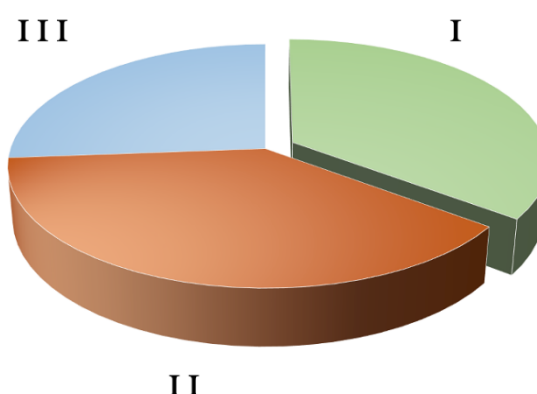
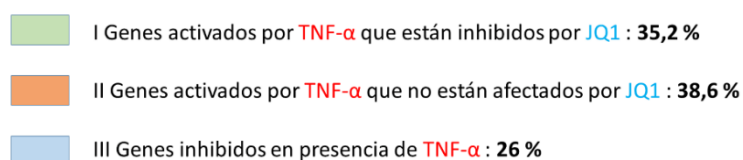
Por último, quisimos estudiar si otros inhibidores de proteínas BET podrían tener efectos similares. Para ello, se evaluó el efecto del I-BET 762 sobre la expresión las citoquinas pro-inflamatorias CCL2, CCL5 e IL6. El tratamiento con este inhibidor generó resultados muy similares a los obtenidos con JQ1 (Figura 3).



**Figura 3. El inhibidor de proteínas BET, I-BET 762, disminuye la expresión de genes pro-inflamatorios en las células renales en cultivo.** Las células tubuloepteliales renales (línea celular HK2), se preincubaron con el inhibidor de proteínas BET (I-BET 762) a 500 nM durante 24 horas, y después se estimularon con TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) durante 3 horas. La expresión génica se evaluó mediante qPCR en tiempo real. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs control (células tratadas con vehículo). #  $p < 0,05$  vs células tratadas con TNF- $\alpha$ .

### 1.1.2- Vías de señalización implicadas en los efectos beneficiosos de JQ1 en células tubuloepiteliales en cultivo.

El siguiente objetivo fue investigar los efectos de JQ1 sobre diferentes rutas de señalización asociadas a la respuesta inflamatoria implicada en la patología renal. Para evaluar los perfiles de expresión génica en un ambiente pro-inflamatorio *in vitro*, se realizó un chip de expresión genómica en células tubuloepiteliales renales estimuladas con TNF- $\alpha$  durante 3 horas. Un análisis global de los resultados mostró que 210 sondas, correspondientes a 193 genes, fueron regulados por TNF- $\alpha$ . De estos genes regulados, 155 (73.8%, 139 genes) estaban aumentados y 55 (26.2%, 54 genes) estaban disminuidos. Entre los inducidos por TNF- $\alpha$ , 74 (35.2%, 62 genes) fueron inhibidos con el tratamiento con JQ1, mientras que 81 (38,6%, 77 genes) no se vieron afectados (Figura 4).



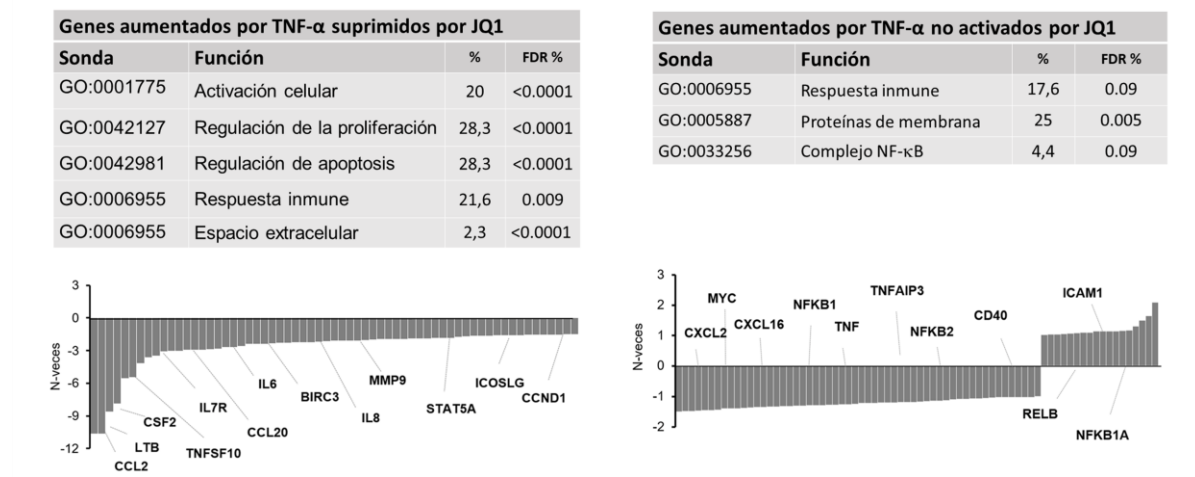
**Figura 4. Representación de la disminución de genes regulados o no por JQ1 en presencia de TNF- $\alpha$ .** Células tubuloepiteliales de la línea HK2, fueron estimuladas en presencia de TNF- $\alpha$  durante tres horas y pretratadas 1 hora con JQ1. En el diagrama se muestran los porcentajes de genes que están alterados en cada caso.

El análisis funcional de vías de señalización reguladas por JQ1 mediante el programa DAVID, mostró que estaban regulados aquellos genes relacionados con la activación celular (CSF2, IL6, IL8, LTB, STAT5A), proliferación (SMAD3, CCND1, ICOSLG), apoptosis (BIRC3, BCL3, TNFSF10) y respuesta inmune (CCL2, CCL20, IL-7R) (Figura 5).



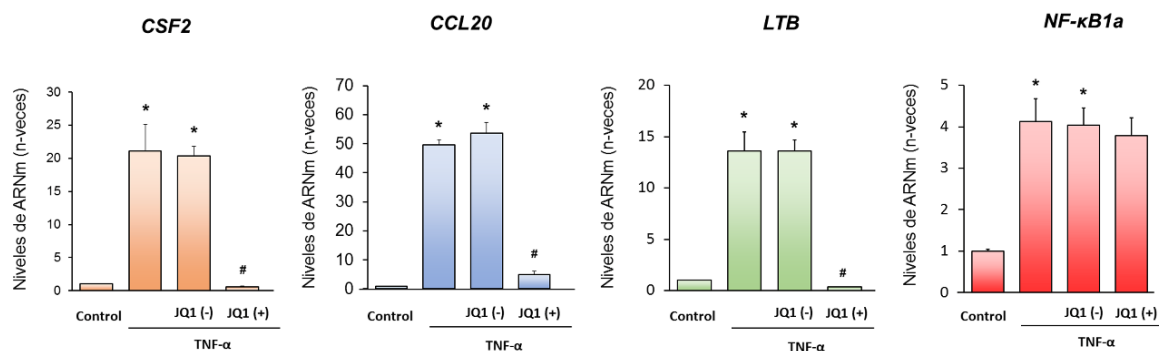
## RESULTADOS

Por el contrario, la expresión de algunas quimioquinas (CXCL2), moléculas de adhesión (ICAM1) y genes asociados al sistema inmune (CD40) permanecieron sin cambios después del tratamiento con JQ1 (Figura 5).



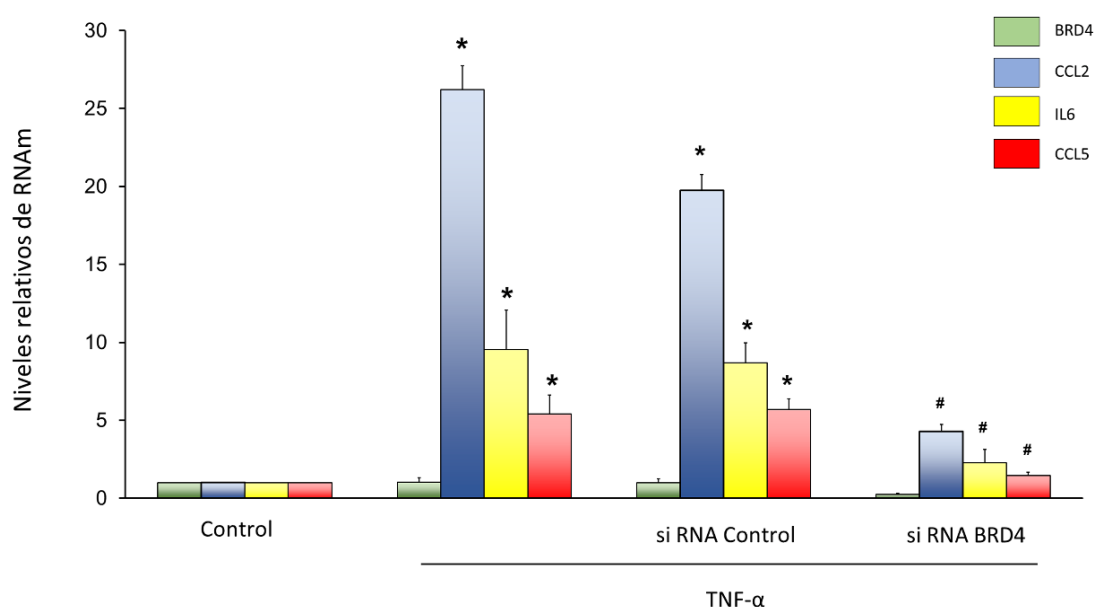
**Figura 5. La inhibición de las proteínas BET regula la maquinaria transcripcional en células tubuloepteliales renales en condiciones pro-inflamatorias.** Células tubuloepteliales humanas de la línea HK2, se estimularon con TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) durante 3 horas en presencia de JQ1. El resultado se analizó mediante array de expresión génica. En la gráfica se muestran los genes aumentados por TNF- $\alpha$  que son inhibidos o no por JQ1.

Estos resultados fueron validados por qPCR en tiempo real, determinando la expresión del ARNm de algunos de estos genes. Así, se observó que JQ1 fue capaz de disminuir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL6, CCL2 y CCL5) y otros mediadores (CSF2, CCL-20 y LTB) inducidos por TNF- $\alpha$ , mientras que no fue capaz de regular genes como NF- $\kappa$ B1a (Figura 6).



**Figura 6. JQ1 inhibe la expresión de algunos genes pro-inflamatorios en las células renales en cultivo.** Células tubuloepteliales se preincubaron con el inhibidor JQ1 a 500 nM durante 24 horas, y después se estimularon con TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) durante 3 horas. La expresión génica se evaluó mediante qPCR en tiempo real. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs control (células tratadas con vehículo). #  $p < 0,05$  vs células tratadas con TNF- $\alpha$ .

Bibliografía previa relaciona BRD4 con procesos inflamatorios y fibróticos, así como con patologías como el cáncer y obesidad (119), (120). Para evaluar el papel de BRD4 en el proceso inflamatorio, se realizaron experimentos de silenciamiento génico de BRD4 en células HK2 estimuladas con TNF- $\alpha$ . En estos experimentos se observó como las células estimuladas con TNF- $\alpha$  y que habían sido sometidas a un tratamiento para silenciar BRD4, presentaban una menor expresión de las citoquinas pro-inflamatorias CCL2, CCL5 e IL6, en comparación con las células incubadas únicamente con TNF- $\alpha$  (no transfectadas) o incubadas con TNF- $\alpha$  y en presencia de un silenciador control (Figura 7).

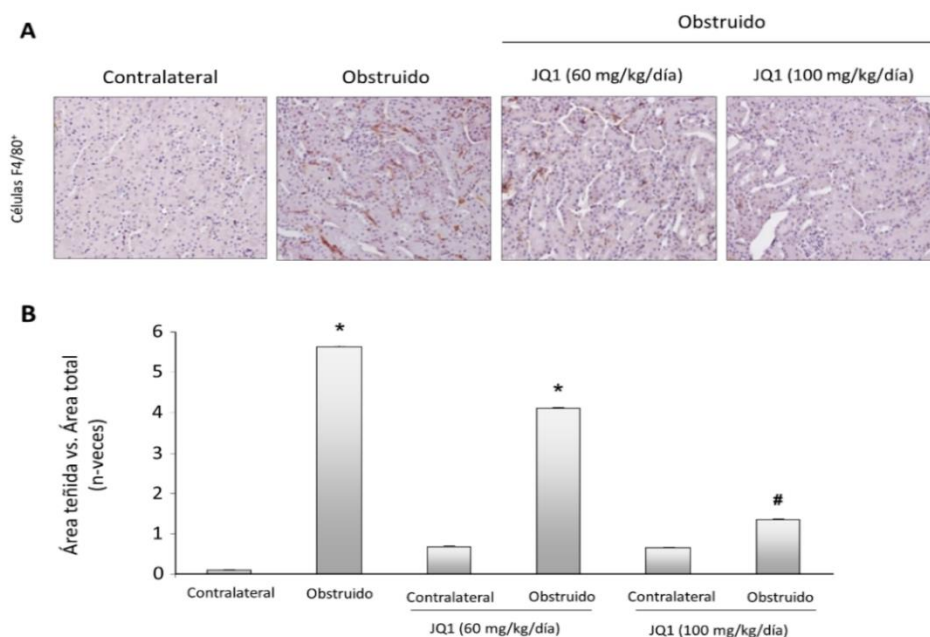


**Figura 7. El silenciamiento de BRD4 inhibe la activación de genes pro-inflamatorios inducida por TNF- $\alpha$  en células tubuloepteliales renales.** Las células fueron transfectadas con un silenciador control o con un silenciador específico de BRD4 (40 nM) durante 48 horas. A continuación, las células se trataron con TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) durante 3 horas. La expresión génica de BRD4 y los genes pro-inflamatorios CCL2, CCL5 e IL6 se analizaron mediante qPCR en tiempo real. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes y los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs las células control no transfectadas. #  $p < 0,05$  vs silenciador control no específico de BRD4.

## 1.2- La inhibición de las proteínas BET, modula la respuesta inflamatoria en diferentes modelos experimentales de daño renal.

### 1.2.1- JQ1 disminuye la inflamación en un modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO).

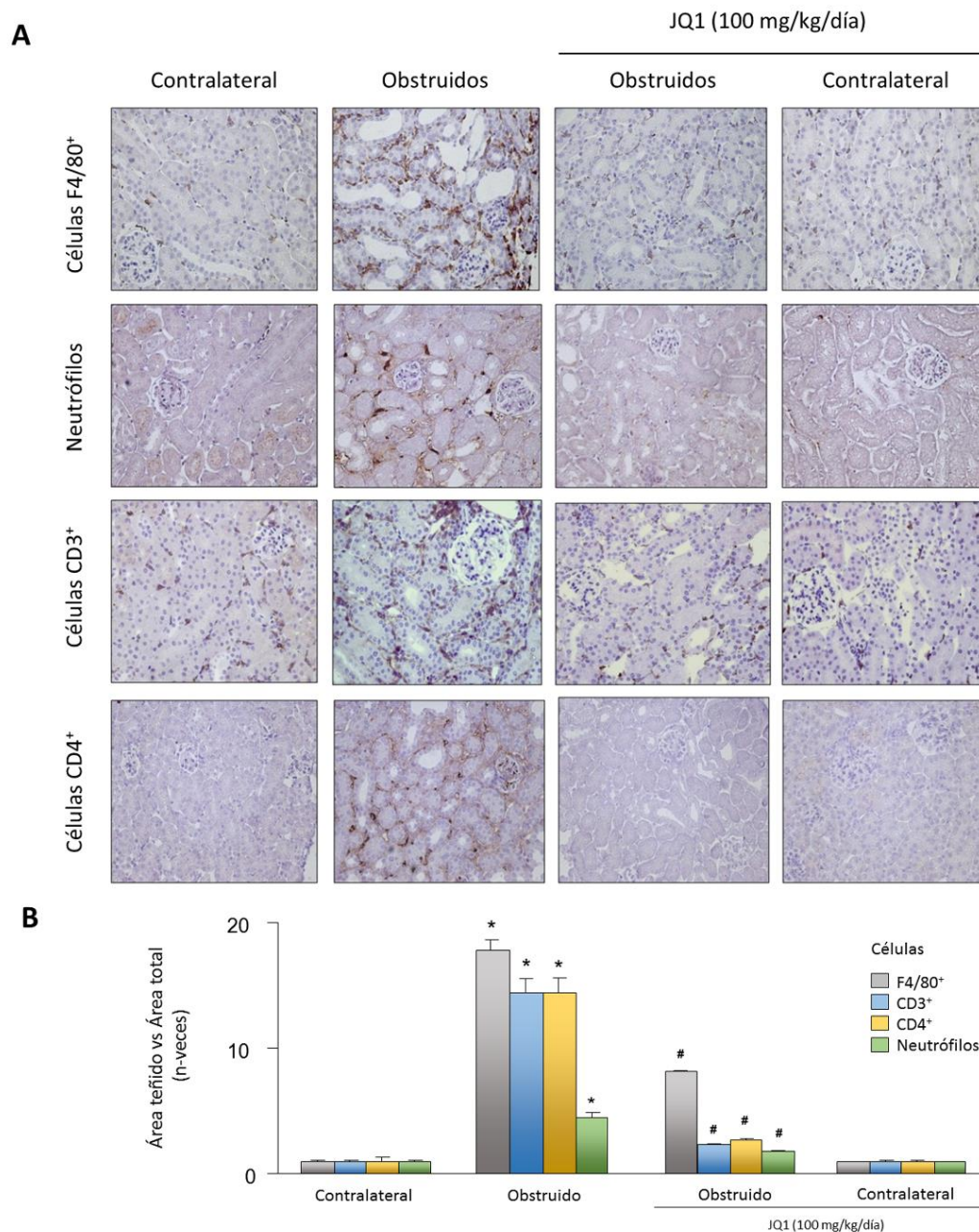
El siguiente paso fue estudiar *in vivo* si la inhibición de las proteínas BET podría atenuar la inflamación renal, proceso clave en la patología renal. Para ello, se seleccionó un modelo de daño renal experimental con un marcado carácter inflamatorio, como es el modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO). En este modelo esa inflamación exacerbada que produce la ligación del uréter, se mantiene a lo largo del tiempo dando paso a una fibrosis progresiva (121), (122). Se realizó un modelo de UUO en el que se administraron dos dosis diferentes de JQ1, 60 y 100 mg/kg/día, estudiando los efectos a 2 días, comenzando el tratamiento con JQ1 un día antes de la cirugía para ligar el uréter. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se caracterizó el infiltrado inflamatorio, y se observó que en los riñones obstruidos a 2 días, existía una marcada presencia de macrófagos (células F4/80<sup>+</sup>), aumento que disminuyó significativamente en aquellos animales tratados con JQ1 de forma dosis dependiente, siendo la dosis de 100 mg/kg/día la que generaba un efecto mas pronunciado (Figura 8).



**Figura 8. JQ1 reduce la inflamación en un modelo de daño renal experimental de obstrucción unilateral del uréter (UUO).**

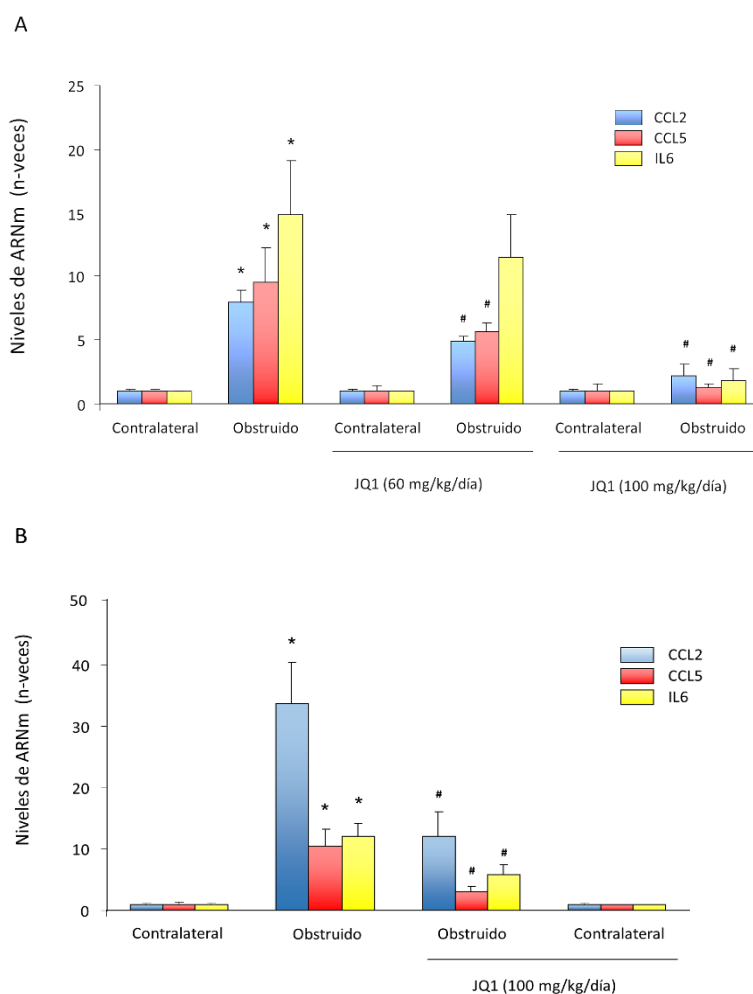
Este modelo se llevó a cabo en ratones de la cepa C57BL/6 y se estudió después de 2 días. Algunos ratones se trataron con JQ1 (60 o 100 mg/kg/día, intraperitoneal) o vehículo (10% de hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina), comenzando 24 horas antes de la obstrucción del uréter. En las secciones de riñón incluidas en parafina se evaluó la presencia de células inflamatorias usando anticuerpos contra macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) (**A**), mostrándose también la cuantificación (**B**). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs los riñones obstruidos tratados con vehículo.

Una vez confirmado en el modelo de 2 días que la dosis de 100 mg/kg/día de JQ1 producía un mayor efecto inhibitorio, quisimos estudiar que ocurría con el proceso inflamatorio a los 5 días. Mediante técnicas de inmunohistoquímica, caracterizamos la población inflamatoria infiltrante en el riñón, con marcajes específicos para diferentes tipos celulares inflamatorios como F4/80<sup>+</sup> (macrófagos), mieloperoxidasa (neutrófilos) o CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> (linfocitos T). Con esta técnica se pudo determinar un aumento de todos los tipos celulares previamente mencionados a los 5 días de obstrucción, y cómo este infiltrado disminuía significativamente en presencia de JQ1 (**Figura 9**). Estos resultados sugieren que la inhibición de las proteínas BET usando JQ1, juega un papel clave en la modulación de la respuesta inflamatoria renal desencadenada en el modelo de UUO.



**Figura 9. JQ1 reduce la inflamación renal en un modelo experimental de obstrucción unilateral del uréter (UUO).** El modelo se llevó a cabo en ratones C57BL/6 y se estudió después de 5 días. Algunos ratones se trataron con JQ1 (100 mg/kg/día, intraperitoneal) o vehículo (10% de hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina), 24 horas antes de la obstrucción. En las secciones de riñones incluidos en parafina se evaluó la presencia de células inflamatorias usando diferentes marcajes según la población: F4/80<sup>+</sup> (monocitos/macrófagos/células dendríticas), mieloperoxidasa (neutrófilos), CD3<sup>+</sup> (linfocitos T) y CD4<sup>+</sup> (linfocitos T helper) (**A**). En las imágenes se muestra un animal representativo de cada grupo (ampliación 200x). También se muestra la cuantificación en la gráfica de la inmunohistoquímica (**B**). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs los riñones obstruidos tratados con vehículo.

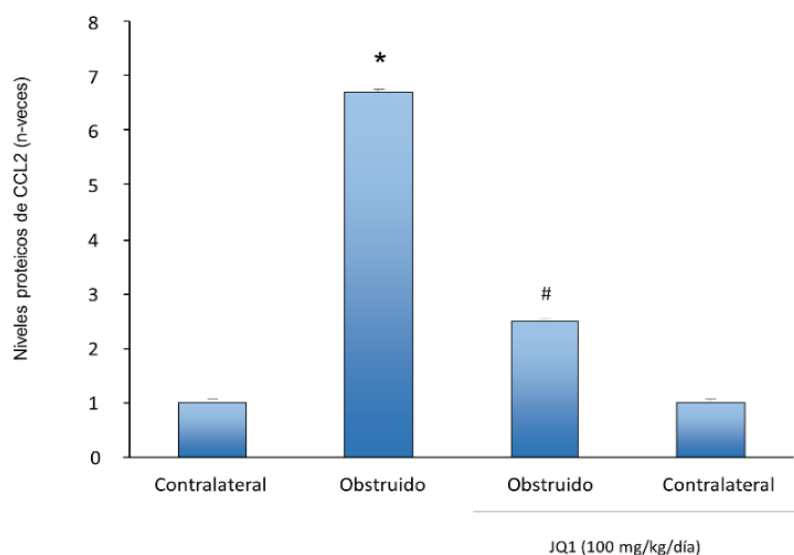
El reclutamiento de células inflamatorias en el riñón depende en parte de la síntesis local de mediadores pro-inflamatorios (123). Por ello, se analizó la expresión génica mediante qPCR en tiempo real de varios marcadores claves en el proceso inflamatorio como CCL2, CCL5 e IL6. Tras este análisis se observó que el tratamiento preventivo de los ratones con JQ1 (100 y 60 mg/kg/día) mostró una disminución de la expresión de estos mediadores, comparados con los riñones obstruidos de los ratones no tratados tras la obstrucción del uréter, tanto a los 2 días (Figura 10A) como a los 5 días (Figura 10B).



**Figura 10. JQ1 disminuye la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en un modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO).** Se observó la expresión de CCL5, CCL2 e IL6 por qPCR en tiempo real, en un modelo de obstrucción unilateral del uréter, durante 5 (A) y 2 días (B) a una dosis de 100 y 60 mg/kg/día. Algunos ratones de la cepa C57BL/6 fueron tratados con JQ1, y otros únicamente con vehículo (10% dehidroxipropil β-ciclodextrina). Los datos se expresan como la media ± EEM de 6-8 animales por grupo. \* p < 0,05 vs contralateral; # p < 0,05 vs riñones obstruidos tratados con vehículo.

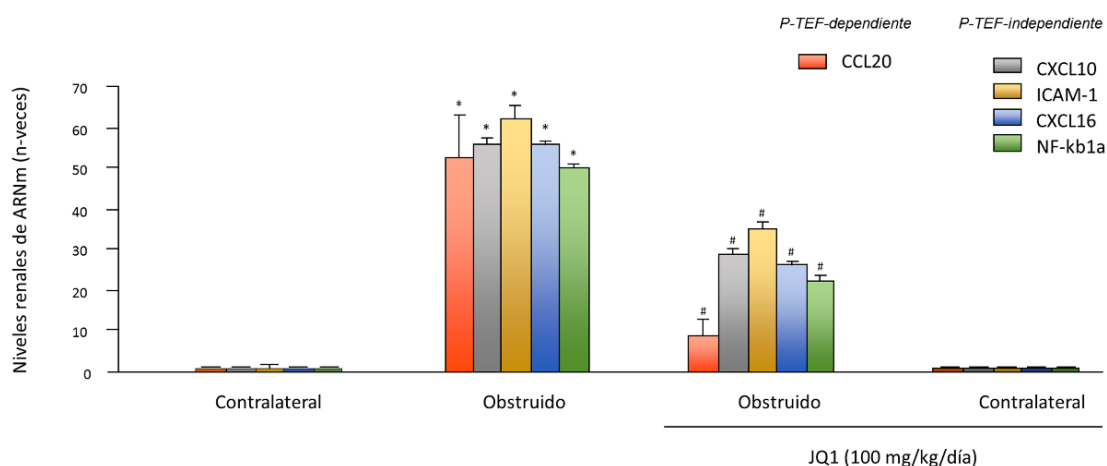
## RESULTADOS

Además en el modelo de obstrucción unilateral del uréter, se evaluó si este aumentó en la expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias se reflejaba también a nivel proteico determinando los niveles de CCL2 mediante técnicas de ELISA. En este modelo se observó que los riñones obstruidos mostraban un aumento de los niveles proteicos de CCL2, aumento que fue revertido de forma significativa por el tratamiento de los ratones con JQ1 (Figura 11).



**Figura 11. La inhibición de proteínas BET, inhibe los niveles renales de CCL2 en un modelo UUO.** Los niveles proteicos de CCL2 fueron evaluados por ELISA en extractos de proteína total. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs riñones obstruidos tratados con vehículo.

Al confirmar que existe una modulación por parte de JQ1 de la expresión de varios mediadores inflamatorios clásicos (CCL2, CCL5 e IL6), se estudió si este inhibidor de proteínas BET era capaz de modular otro tipo de citoquinas también de carácter inflamatorio. Se observó que JQ1 también disminuyó la expresión de CXCL16, moléculas de adhesión como ICAM-1, componentes de la vía de NF- $\kappa$ B como NF- $\kappa$ B1a, y citoquinas como CCL20, sobre la que JQ1 ejerció una inhibición mucho más marcada. (Figura 12).



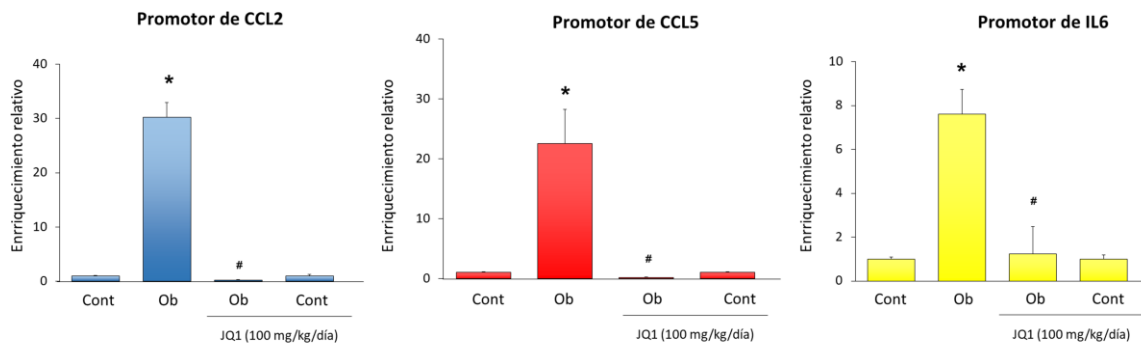
**Figura 12. JQ1 inhibe la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en un modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO).** La expresión de estas citoquinas fue evaluada por qPCR en tiempo real. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs riñones obstruidos tratados con JQ1.

### 1.2.2.- JQ1 bloquea la unión de BRD4 a regiones promotoras de genes inflamatorios.

Se ha descrito a BRD4 como una proteína necesaria para la formación del complejo transcripcional, ya que sirve de nexo entre la cromatina, y las diferentes proteínas y factores de transcripción que forman parte de la maquinaria transcripcional (95). Para determinar si el mecanismo anti-inflamatorio de JQ1 es debido a la unión directa de BRD4 a las regiones promotoras próximas a histonas acetiladas, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina con un anticuerpo anti-BRD4. Los resultados de estos experimentos, mostraron que en los riñones obstruidos, BRD4 estaba unido de forma significativamente mayor a los promotores de CCL2, CCL5 e IL6 que en los riñones contralaterales. Por otro lado, esta unión de BRD4 a las zonas promotoras de genes inflamatorios fue significativamente menor en los riñones obstruidos de los ratones tratados con JQ1 (Figura 13).

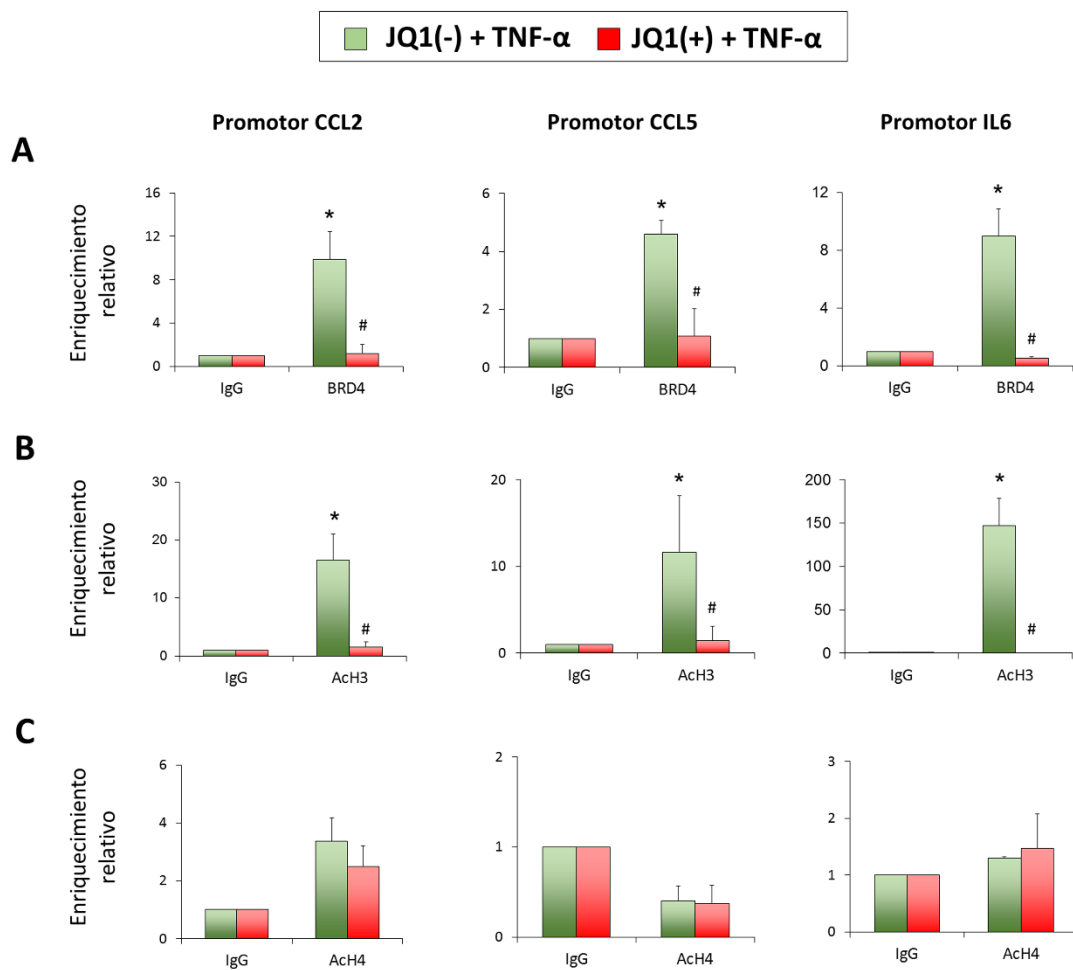


## RESULTADOS



**Figura 13. BRD4 se une a los promotores de genes pro-inflamatorios en un modelo de UUO.** Se realizó un ensayo de chip en un modelo de obstrucción unilateral del uréter UUO. El enriquecimiento relativo de BRD4 a los promotores de CCL5, CCL2 e IL6, fue evaluado mediante qPCR en tiempo real. Los resultados se expresan como el enriquecimiento n veces del anticuerpo anti-BRD4 en relación con un anticuerpo de control negativo (IgG de conejo normal) y se normaliza frente al riñón contralateral (considerado como 1). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs riñones obstruidos tratados con vehículo.

Observando los resultados del ensayo de inmunoprecipitación de cromatina *in vivo*, quisimos corroborar estos resultados en experimentos *in vitro*. Para ello, se realizaron experimentos en células tubuloepteliales estimuladas con  $\text{TNF-}\alpha$ , y preincubadas con JQ1 o con su enantiomero sin actividad biológica JQ1 (-). Se observó que en presencia de un estímulo inflamatorio como  $\text{TNF-}\alpha$ , BRD4 se encuentra unido a los promotores de CCL2, CCL5 e IL6, y que el inhibidor de proteínas BET, JQ1 bloqueó significativamente la unión de BRD4 a estos promotores, efecto que no se observó con el enantiomero JQ (-) (Figura 14A). Estos resultados confirman lo observado en experimentos *in vivo*. Las proteínas BET reconocen residuos acetilados en histonas, facilitando el reclutamiento de la maquinaria de activación transcripcional (84), y ya que las acetilaciones en las lisinas de las histonas son claves para el reclutamiento de diferentes proteínas que van a dar lugar al complejo transcripcional, el siguiente objetivo fue estudiar cuál de las histonas acetiladas estaba más ligada a los promotores de CCL2, CCL5 e IL6. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina utilizando anticuerpos frente a las histonas acetiladas H3 y H4, que forman parte del octamero del nucleosoma, se pudo observar que las regiones promotoras de estas citoquinas estaban más estrechamente unidas a las lisinas acetiladas de la histona H3 en comparación con la unión a la histona H4 acetilada. Esta unión de los promotores a las histonas acetiladas se vio inhibida en presencia de JQ1 y no se vio afectada con JQ1 (-) (Figura 14 B Y C).



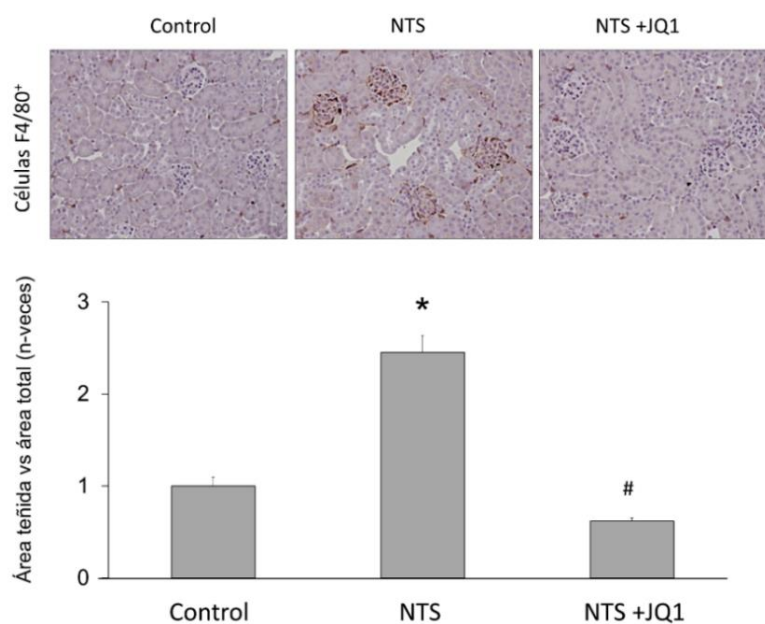
**Figura 14. JQ1 inhibe la unión directa de BRD4 a los promotores de CCL2, CCL5 e IL6 a través de histonas acetiladas en células tubuloepteliales.** Células de la línea HK2 fueron pretratadas con JQ1 (-) o JQ1 (+) (500 nM) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) durante 3 horas. Se realizaron ensayos de chip con anticuerpos específicos contra **(A)** BRD4, **(B)** histona acetilada H3 (AcH3) y **(C)** histona acetilada H4 (ACH4). Se utilizó una IgG de conejo como control negativo. El enriquecimiento de las secuencias de ADN correspondiente a los promotores de los genes de CCL2, CCL5 e IL6 con BRD4, se midió mediante qPCR en tiempo real utilizando cebadores específicos. Los datos mostrados son de tres experimentos independientes, y cada qPCR se realizó por triplicado. Los resultados se representan como el enriquecimiento relativo de BRD4 a la zona del promotor específico en comparación con el control negativo (IgG). \*  $p < 0,05$  vs correspondiente IgG; #  $p < 0,05$  vs células tratadas con JQ1 (+).

## RESULTADOS

### 1.2.3.- JQ1 disminuye la inflamación renal en un modelo de nefritis inmune, producida por un suero anti anti-membrana basal glomerular murino (NTS).

La administración de un suero nefrotóxico a los ratones, induce una nefritis inmune que se genera debido a la producción de anticuerpos contra la membrana basal del glomérulo. Este suero promueve la pérdida de la integridad glomerular y con ello un daño progresivo en la barrera de filtración haciendo que este modelo sea comúnmente utilizado para estudiar los mecanismos de la glomerulonefritis crescenta desarrollada en humanos (124). Por ello, quisimos evaluar el efecto de la inhibición de las proteínas BET en este modelo experimental de daño renal inmune.

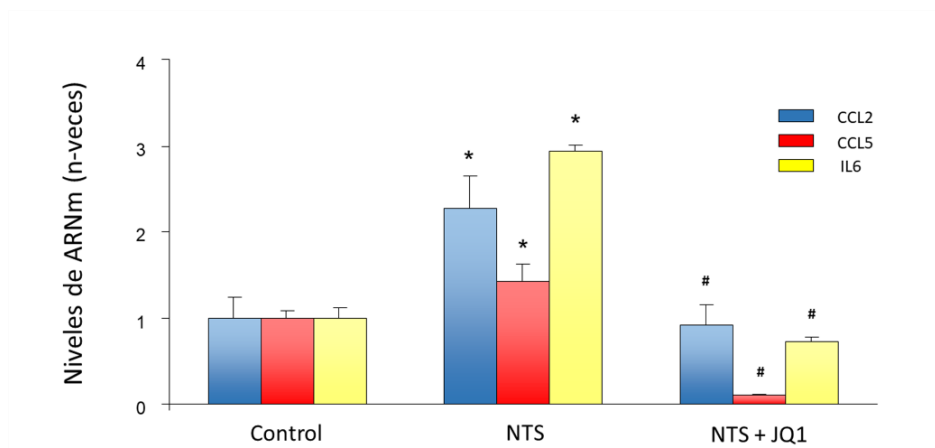
La administración del suero NTS a los ratones produjo un aumento del número de células infiltrantes (macrófagos) en el intersticio renal así como en el glomérulo; aumento que disminuyó significativamente en aquellos ratones que habían sido tratados preventivamente con JQ1 antes de la administración del suero (Figura 15).



**Figura 15. JQ1 disminuye la inflamación renal en un modelo de nefritis inmune producida por un suero nefrotóxico (NTS).**

La nefritis en ratones se indujo mediante la administración de un suero anti-membrana basal glomerular inyectado en el seno retro-orbital del ojo. Los efectos de suero NTS en los ratones se estudiaron 10 días después de la inmunización. Los ratones fueron tratados o no con JQ1 (100 mg/kg/día) comenzando 24 horas antes de la primera inyección del suero. Los datos están expresados con una media  $\pm$  EEM de 5 -7 animales por grupo. \*p < 0.05 vs control; # p < 0.05 vs. NTS.

Observando que el infiltrado de macrófagos y monocitos estaba disminuido también en este modelo de nefritis inmune, quisimos evaluar la expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias como CCL5, CCL2 e IL6, en los ratones tratados con JQ1. Pudimos observar que el perfil de expresión génica de estas citoquinas, era similar al observado en el modelo de obstrucción unilateral del uréter, presentando un aumento en los ratones inyectados con el suero nefrotóxico, aumento que se veía significativamente disminuido con el tratamiento con JQ1.(Figura 16).

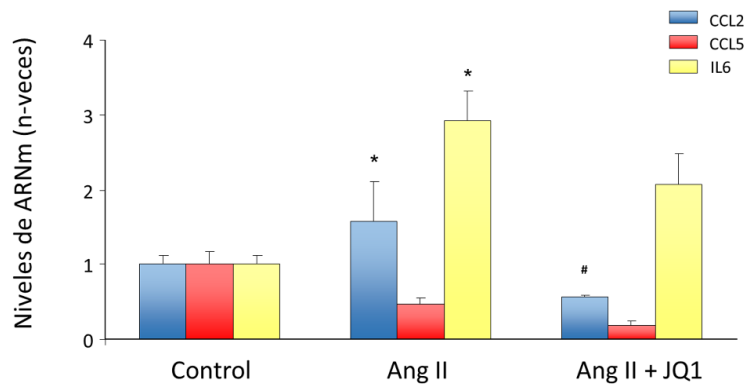


**Figura 16. JQ1 disminuye la inflamación renal en un modelo de nefritis inmune inducida por suero nefrotóxico (NTS).** Los niveles de citoquinas pro-inflamatorias CCL2, CCL5 e IL6, fueron evaluados por qPCR en tiempo real. Los datos están expresados con una media  $\pm$  EEM de 5 -7 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs control; #  $p < 0.05$  vs NTS.

### 1.2.3.- JQ1 disminuye la inflamación renal en el modelo de infusión de angiotensina II.

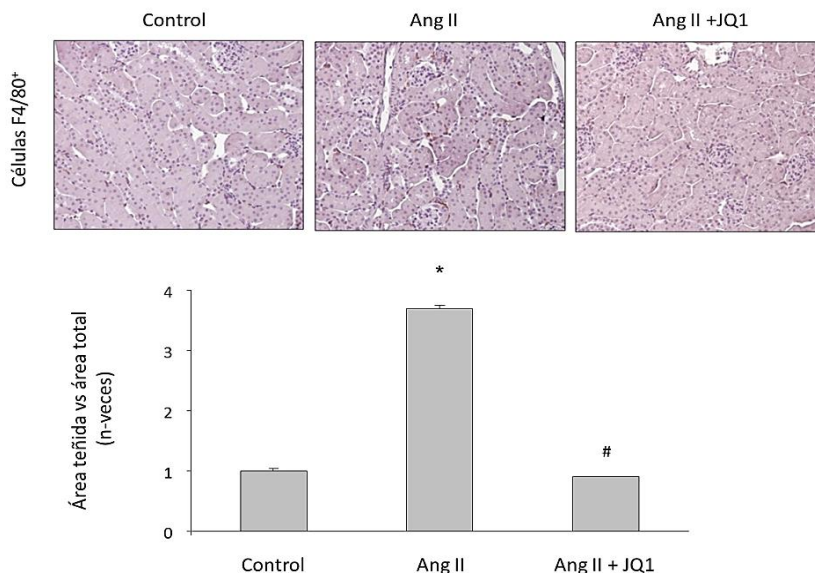
El modelo de administración sistémica de Angiotensina II (Ang II) es un modelo de daño renal no inmune asociado a hipertensión (125). Por ello, se evaluó, también el efecto de JQ1 sobre este modelo que presenta una etiología diferente. En primer lugar quisimos estudiar en este modelo el perfil de expresión de citoquinas pro-inflamatorias como CCL2, CCL5 e IL6. Pudimos observar que los ratones que fueron infundidos con Ang II, presentaban un aumento de la expresión renal de CCL2 e IL6 pero no de CCL5. Aumento que disminuyó claramente en aquellos animales tratados con JQ1, siendo esta disminución estadísticamente significativa solo en el caso de CCL2 (Figura 17).

## RESULTADOS



**Figura 17. JQ1 disminuye la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en un modelo de infusión sistémica de Ang II.** Los ratones fueron sometidos a una cirugía para implantarles de forma subcutánea una mini bomba osmótica que permite la infusión constante de Ang II. Tras el sacrificio se procesó el tejido para realizar técnicas de qPCR en tiempo real para evaluar los niveles de CCL2, CCL5 e IL6. Los datos están expresados con media  $\pm$  EEM de 5 -7 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs control; #  $p < 0.05$  vs Ang II.

La Ang II es un péptido cuya administración sistémica induce una respuesta inflamatoria renal temprana a los 3 días (126). Mediante técnicas de inmunohistoquímica se observó que los riñones de los ratones infundidos con Ang II, presentaban una mayor población de macrófagos intersticiales comparados con los riñones de los animales control. El bloqueo de las proteínas BET produjo una disminución significativa de la presencia de macrófagos F 4/80<sup>+</sup> en comparación con los ratones infundidos con Ang II. (Figura 18).



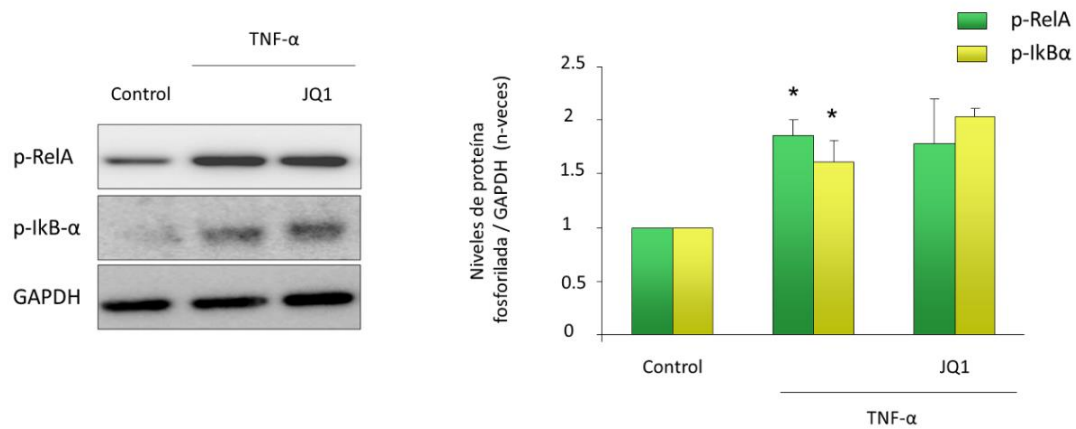
**Figura 18. JQ1 modula el infiltrado inflamatorio en un modelo de infusión de Ang II.** La presencia de células inflamatorias F4/80<sup>+</sup>, fueron evaluados por técnicas de inmunohistoquímica, comparando el área teñida vs área total. Los datos están expresados con una media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs control; #  $p < 0.05$  vs ratones infundidos con Ang II.

En resumen, los resultados obtenidos en tres modelos experimentales de daño renal de diferente etiología, muestran que la inhibición de las proteínas BET utilizando JQ1 disminuye la respuesta inflamatoria renal, al inhibir la expresión génica de mediadores pro-inflamatorios (CCL5, CCL2 e IL6), a través del bloqueo de la unión de BRD4 a los promotores de dichos genes.

## **2.- La inhibición de las proteínas BET bloquea la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B en el daño renal experimental.**

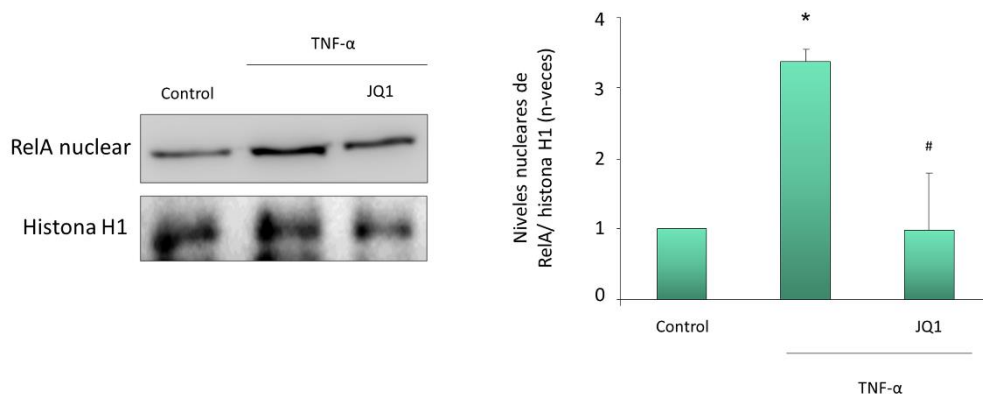
Con el fin de explicar los efectos anti-inflamatorios de JQ1, se estudió el posible papel de las proteínas BET en la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B, mecanismo molecular clave en el proceso inflamatorio en el riñón (19). Las proteínas BET, tienen la capacidad de unirse a residuos acetilados en otras proteínas tanto histonas como no histonas, y existe bibliografía previa que describe como BRD4 reconoce y se une a la lisina acetilada 310 de la subunidad p65/RelA de NF- $\kappa$ B (127), (128). La activación de la vía clásica de NF- $\kappa$ B consta de varios procesos. El complejo NF- $\kappa$ B permanece de forma inactiva en la célula, unido a la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ , siendo su dímero más abundante el formado por las subunidades p50 y p65/RelA. Uno de los primeros pasos en la activación de esta ruta, es la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y de p65 (19). Además se ha descrito, que la fosforilación en la Ser 536 de p65/RelA esta implicada en la regulación de la expresión de genes como CCL2 (129). En primer lugar, quisimos estudiar el efecto de la inhibición de las proteínas BET, en la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B en células tubuloepiteliales humanas en cultivo. Estos experimentos *in vitro* mostraron como en presencia de TNF- $\alpha$  se inducía la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y de RelA, fosforilación que no se veía modificada al bloquear las proteínas BET con JQ1 (Figura 19).

## RESULTADOS



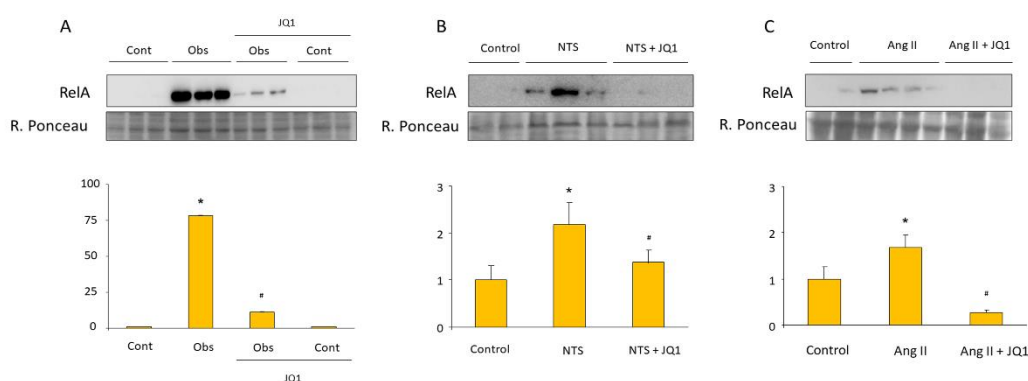
**Figura 19. Efecto del tratamiento con JQ1 sobre la activación de la vía NF-κB en células tubuloepiteliales humanas en cultivo.** Las células se pretrataron con JQ1 a una concentración de 500 nM durante 1 hora y se estimularon con 5 ng/ml de TNF-α durante 20 min. La activación de NF-κB se evaluó en extractos de proteína total por western blot, midiendo los cambios en los niveles de fosforilación de IkBα (p-IkBα) y los niveles de fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB (p-p65). Como control de carga se utilizó GAPDH. También se muestra la cuantificación del western blot realizado mediante el programa Quantity One. En los datos se muestran la media ± EEM de tres experimentos independientes. \* p < 0,05 vs control; # p < 0,05 vs TNF-α.

En los estudios realizados en extractos nucleares, pudimos observar como en las células tratadas con JQ1 los niveles nucleares de RelA estaban disminuidos significativamente respecto a las células estimuladas con TNF-α. Estos resultados sugirieron que es en el núcleo, donde JQ1 ejerce sus funciones inhibitorias sobre la vía de activación de NF-κB (Figura 20).



**Figura 20. JQ1 produce una disminución de los niveles de p65/RelA nuclear en un ambiente pro-inflamatorio en células tubuloepiteliales humanas en cultivo.** Las células se pretrataron con JQ1 a una concentración de 500 nM durante 1 hora y se estimularon con 5 ng/ml de TNF-α durante 20 min. En la figura se muestran los niveles nucleares de p65 que se evaluaron por western blot y fueron normalizados con los niveles de histona H1. En los datos se muestran la media y EEM de tres experimentos independientes. \* P < 0,05 vs control; # p < 0,05 vs TNF-α.

Trabajos previos, entre los que se encuentran los de nuestro grupo, muestran que en el bloqueo de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B en modelos de daño renal experimental, produce una disminución del infiltrado inflamatorio en el riñón así como la expresión de citoquinas pro-inflamatorias clásicas como CCL5, CCL2 e IL6. (125). Tras observar como JQ1 era capaz de modular el proceso inflamatorio en tres modelos diferentes de daño renal, quisimos analizar si esto podía estar relacionado con una regulación de la vía de NF- $\kappa$ B. En todos los modelos estudiados, se observó un aumento de la traslocación nuclear de RelA, aumento que disminuyó significativamente con el tratamiento con JQ1. (Figura 21 A, B y C).



**Figura 21. JQ1 disminuye los niveles de p65/RelA en el núcleo en tres modelos de daño renal diferentes.** Los niveles de p65 fueron evaluados en extractos nucleares de tres modelos experimentales de daño renal, y analizados por técnicas de western blot. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-7 animales por grupo. \* P < 0,05 vs contralateral vs NTS vs Ang II; # p < 0,05 vs los riñones obstruidos tratados con JQ1 vs NTS + JQ1 vs Ang II + JQ1.

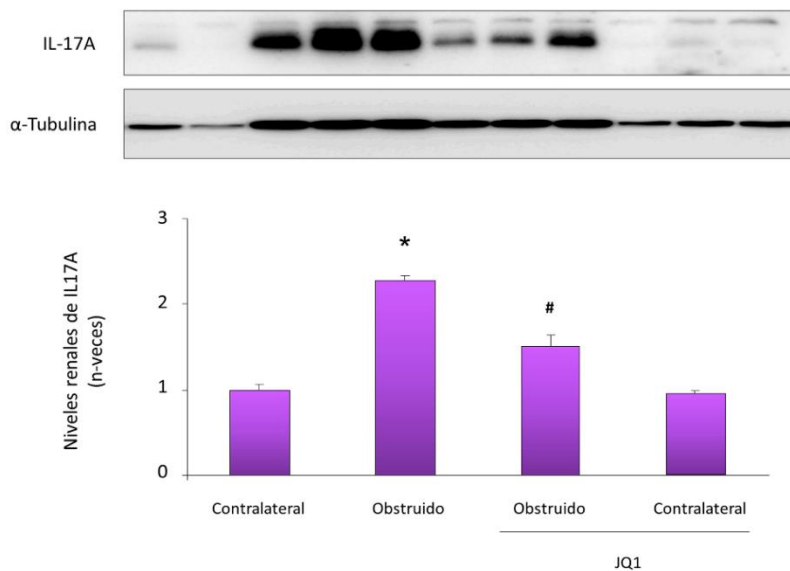
Estos datos sugieren que la inhibición de las proteínas BET mediante JQ1, produce una disminución de los niveles nucleares de p65/RelA bloqueando la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B y esto conlleva a una regulación del proceso inflamatorio asociado al daño renal experimental.



### 3.- JQ1 inhibe la respuesta inflamatoria Th17 en la inflamación renal experimental.

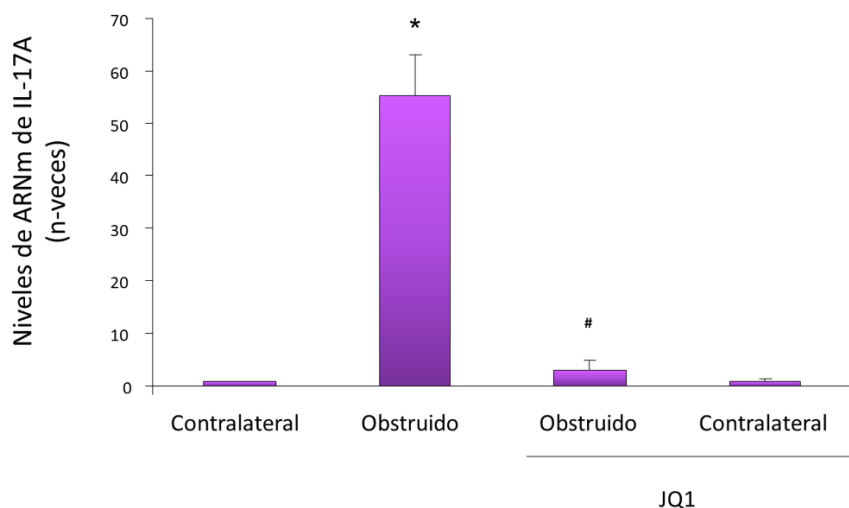
Existen evidencias que sugieren que la respuesta inmune Th17, y su citoquina efectora IL-17A, contribuyen a la patogénesis de la enfermedad renal (130), (131), (132). Se ha descrito que las proteínas BET juegan un papel clave en la diferenciación de linfocitos Th17 (133). Por todo esto, se quiso observar como influía el tratamiento con JQ1 sobre la respuesta inmune Th17 en diferentes modelos de daño renal experimental.

En el modelo UUO mediante western blot se observó como el bloqueo de la acción de las proteínas BET utilizando JQ1, disminuía los niveles renales de IL-17A en los riñones obstruidos, comparados con los riñones no tratados con JQ1 (Figura 22).



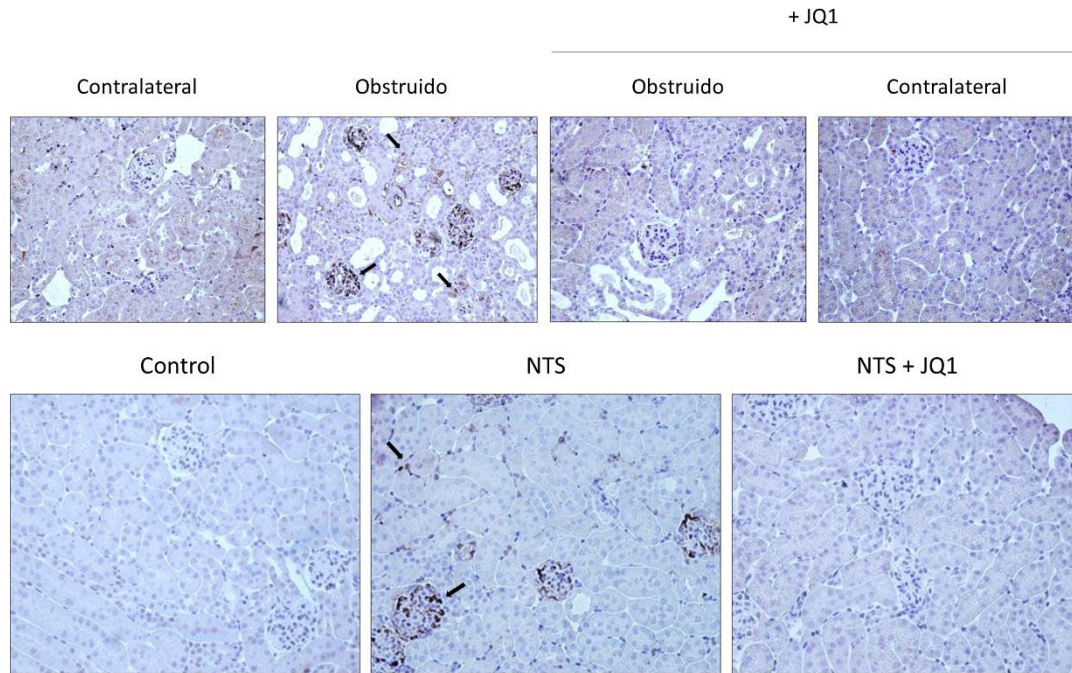
**Figura 22. Los niveles proteicos de IL-17A están modulados por JQ1 en un modelo UUO.** Los niveles de IL-17A fueron analizados por western blot, con un anticuerpo específico contra IL-17A en un modelo de obstrucción unilateral del uréter. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs riñones obstruidos tratados con JQ1.

De la misma manera, quisimos evaluar los niveles renales de ARNm de IL-17A. Observamos que el tratamiento de los riñones con JQ1, indujo una marcada inhibición de la expresión génica de IL-17A en los riñones obstruidos (Figura 23).



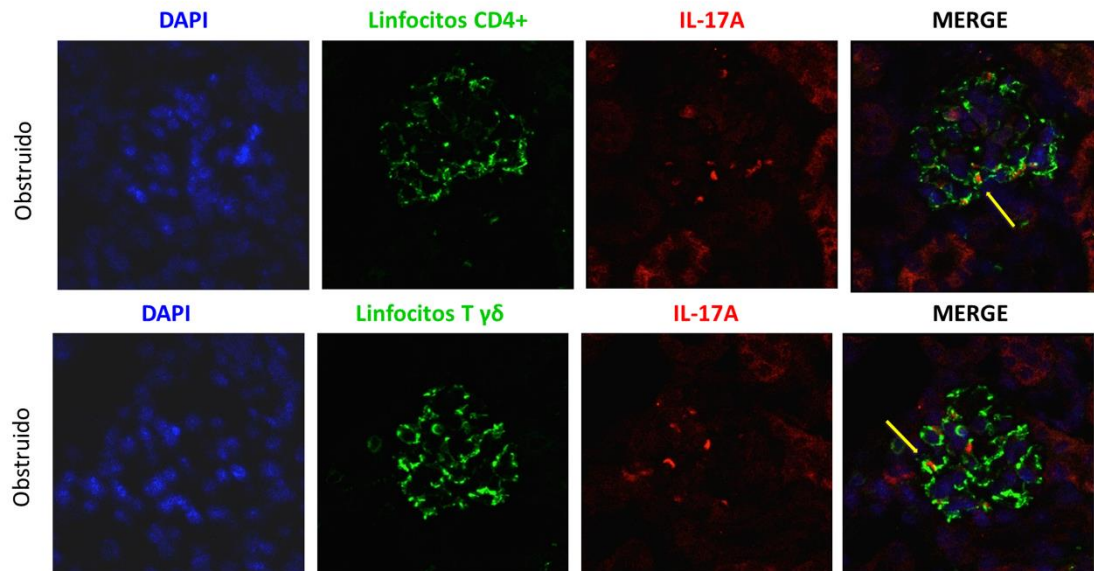
**Figura 23. JQ1 modula la expresión génica de IL-17A en un modelo UUO.** Los niveles de IL-17A fueron estudiados por qPCR en tiempo real en un modelo de obstrucción unilateral del uréter. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs riñones obstruidos tratados con JQ1.

Por otro lado se estudió la expresión de IL-17A a nivel tisular en los diferentes modelos de daño renal. En primer lugar se quiso evaluar, mediante técnicas de inmunohistoquímica, la presencia de IL-17A tanto en el modelo de UUO como en el modelo de nefritis inmune, y se observó como la expresión de esta citoquina se localizó en ciertas zonas del intersticio renal aunque casi en su totalidad, en la región glomerular. El tratamiento de los ratones con JQ1 produjo una disminución significativa de la expresión de IL-17A en los riñones dañados de ambos modelos en comparación con los riñones control (Figura 24).



**Figura 24. El bloqueo de las proteínas BET disminuye la presencia de IL17A tanto en un modelo de nefritis inmune (NTS) como en un modelo UUO.** Los niveles de IL-17A se estudiaron por técnicas de inmunohistoquímica usando un anticuerpo específico contra IL-17A mostrando en la imagen una foto representativa de cada grupo de los dos diferentes modelos.

Los linfocitos Th17 son los principales productores de IL-17A, no obstante existen otros tipos celulares capaces de producir esta citoquina, como linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), linfocitos CD3<sup>+</sup>, linfocitos  $\gamma\delta$ , células NK, neutrófilos y células vasculares y tubuloepiteliales (134). Para observar que tipo de células secretaban IL-17A a nivel tisular, se determinó la presencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> y linfocitos T  $\gamma\delta$  así como su colocación con la expresión de esta citoquina. (Figura 25).



**Figura 25. Localización de células productoras de IL-17A en riñones dañados.** La imagen muestra una inmunolocalización de células productoras de IL-17A (rojo) en riñones obstruidos tratados con JQ1. Las células inmunes fueron caracterizadas con un anticuerpo frente a linfocitos CD4 o  $\gamma\delta$ . La doble inmunotinción of CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> (células Th 17) o  $\gamma\delta$ /IL-17A<sup>+</sup> se muestran con las flechas amarillas. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). La figura muestra una foto representativa de cada grupo por microscopia confocal.

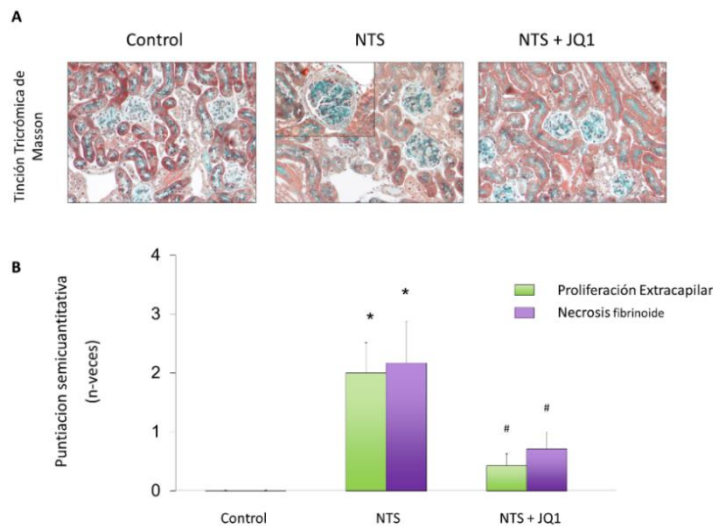
Estos resultados sugieren que la inhibición de las proteínas BET, suprime la respuesta inmune Th17 asociada al daño renal experimental, tanto inmune como no inmune, mostrando un mecanismo adicional de sus efectos anti-inflamatorios.

## 4.- La inhibición de proteínas BET disminuye la fibrosis renal.

El proceso fibrótico es consecuencia de un daño que se cronifica en el tiempo. Esta fibrósis viene acompañada de un depósito de diferentes componentes de la matriz extracelular, como son Fibronectina o Colágeno tipo I, III o IV (51). El proceso fibrotico, es clave en la progresion de la enfermedad renal cronica, y por ello quisimos valorar el efecto del bloqueo de las proteínas BET con JQ1, sobre la fibrosis tanto *in vivo* como *in vitro*.

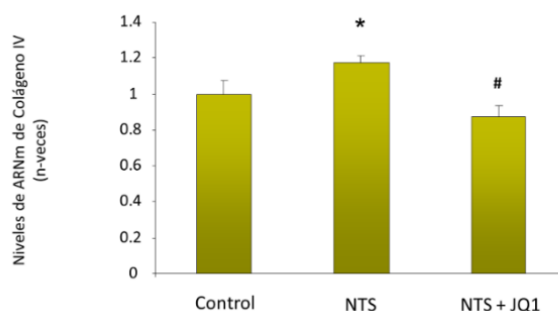
### 4.1- El bloqueo de las proteínas BET disminuye la fibrosis en un modelo de nefritis inmune producido por un suero anti-membrana basal glomerular (NTS).

Una de las características más importantes del modelo de nefritis inmune producida por un suero anti-membrana basal glomerular (NTS), es la presencia de un marcado daño a nivel glomerular. Por ello, quisimos ver como afectaba, la inhibición de las proteínas BET, a las lesiones glomerulares. Se pudo observar, utilizando la tinción Tricrómica de Masson (Figura 26A), que tanto la necrosis fibrinoide como la proliferación extracapilar, dos parámetros que nos muestran el estado del glomérulo, estaban aumentados de manera significativa en los riñones de los ratones inyectados con el suero NTS. Estos parámetros se vieron disminuidos en los riñones de los ratones tratados con JQ1 (Figura 26B).



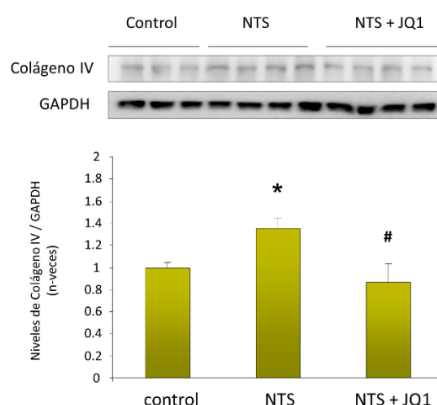
**Figura 26. JQ1 disminuye el daño renal glomerular y los depósitos de matriz extracelular en un modelo de nefritis inmune.** La nefritis en ratones se indujo mediante la administración de un suero anti-membrana basal glomerular inyectado a través del seno retro-orbital del ojo. Los efectos del suero NTS en los ratones se estudiaron 10 días después de la inmunización. Los ratones fueron tratados o no con JQ1 (100 mg/kg/día) comenzando 24 horas antes de la primera inyección de NTS. Se midió la necrosis fibrinoide y la proliferación extracapilar y los depósitos de matriz extracelular se valoraron por una tinción tricrómica de Masson (A y B). Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo. \*p < 0.05 vs control; # p < 0.05 vs. NTS.

El modelo de nefritis inmune mediado por un suero NTS, se caracteriza por daño glomerular asociado a expansión de la matriz mesangial (135). El Colágeno IV es el componente más importante de la membrana basal del glomérulo, y por ello quisimos evaluar su modulación en este modelo de daño renal. En primer lugar se estudió mediante qPCR en tiempo real, la expresión génica del pro-Colágeno IV en los riñones inyectados con el suero NTS, y se observó que existe un aumento en los niveles de ARNm, que disminuían al bloquear la función de las proteínas BET utilizando JQ1 (Figura 27).



**Figura 27. El bloqueo de las proteínas BET disminuye la expresión génica del pro-Colágeno tipo IV en el riñón.** Los niveles de ARNm se evaluaron por técnicas de qPCR en tiempo real. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo. \*p < 0.05 vs control; # p < 0.05 vs NTS.

Posteriormente, se evaluaron los niveles proteicos renales de Colágeno IV. Mediante técnicas de western blot, utilizando un anticuerpo específico para Colágeno IV, se observó que los ratones inyectados con el suero NTS, presentaban mayores niveles de Colágeno VI con respecto a los ratones control. Estos niveles de Colágeno IV, disminuían significativamente con el tratamiento con JQ1 (Figura 28).

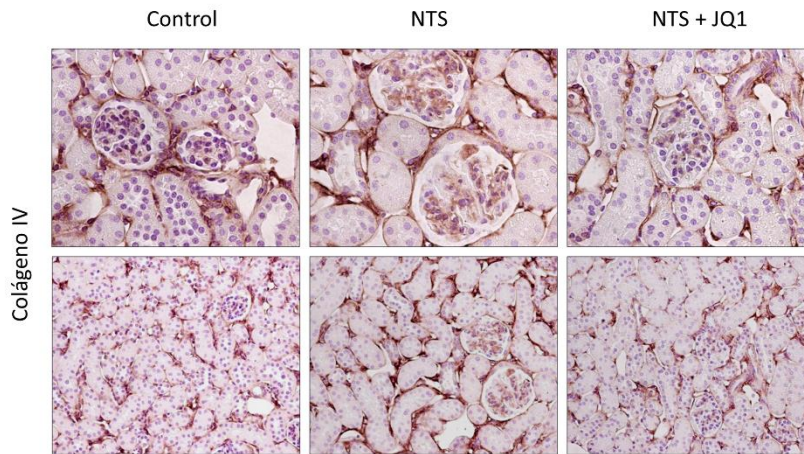


**Figura 28. El tratamiento con JQ1 disminuye los niveles proteicos de Colágeno IV en el riñón.** Los niveles de Colágeno tipo IV se evaluaron por Western Blot. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo. \*p < 0.05 vs control; # p < 0.05 vs NTS.



## RESULTADOS

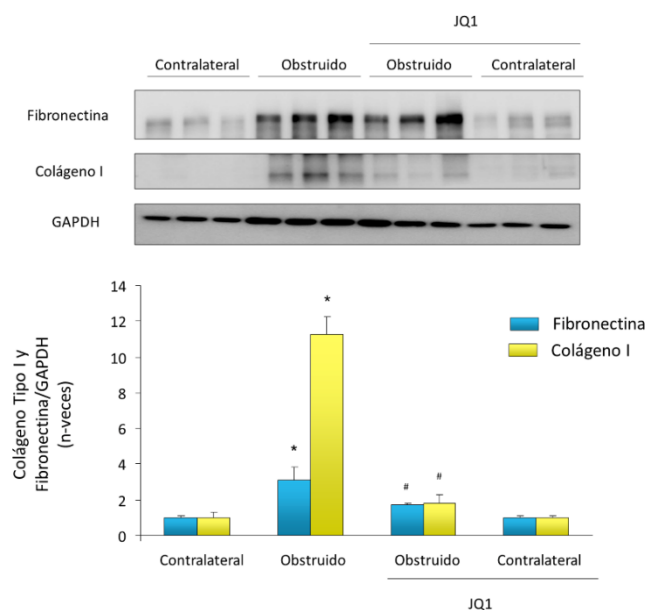
Por último, se determinaron los niveles de Colágeno IV mediante técnicas de inmunohistoquímica en secciones de parafina. En los riñones dañados por el suero NTS, existía un mayor acumulo a nivel glomerular de Colágeno IV, que estaba disminuido en los ratones tratados con JQ1 (Figura 29).



**Figura 29. El tratamiento con JQ1 disminuye los niveles proteicos de Colágeno IV en el riñón.** Los niveles de Colágeno tipo IV se evaluaron por técnicas de inmunohistoquímica. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EEM de 5 -7 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs control; # $p < 0.05$  vs NTS.

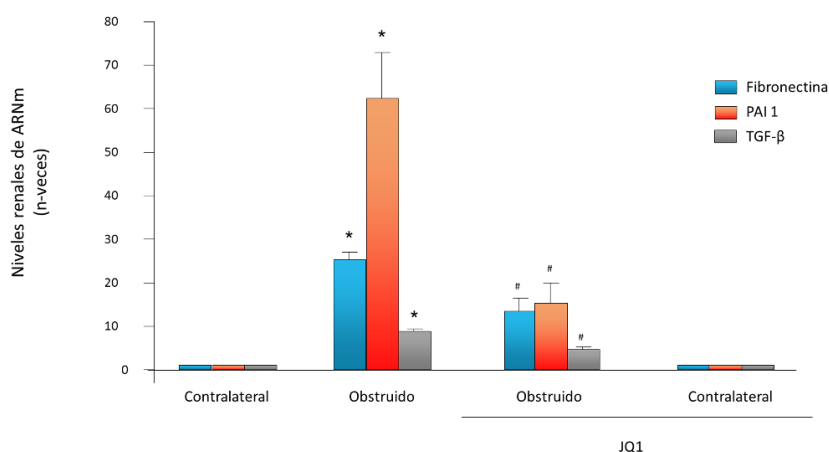
### 4.2- El tratamiento con JQ1 inhibe el proceso fibrótico en un modelo de obstrucción unilateral del uréter.

A continuación evaluamos el efecto de la inhibición de las proteínas BET en la fibrosis renal en un modelo UUO. En primer lugar, se realizaron experimentos de western blot para medir los niveles de Colágeno I y Fibronectina. En estos experimentos se pudo observar un aumento en la síntesis de estos dos componentes de la matriz extracelular, y como en los riñones obstruidos de los ratones tratados con JQ1, estos niveles estaban disminuidos significativamente (Figura 30).



**Figura 30. La inhibición de las proteínas BET disminuye los niveles de Fibronectina Y Colágeno tipo I en un modelo UUO.** Los niveles proteicos de Fibronectina y Colágeno tipo I, fueron determinados por técnicas de Western Blot, mediante anticuerpos específicos de cada proteína. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*p < 0,05 vs contralateral; #p < 0,05 vs riñones obstruidos tratados con JQ1.

Por técnicas de qPCR en tiempo real, se quisieron estudiar también, los niveles de mediadores pro-fibróticos como PAI1 o TGF- $\beta$ , así como componentes de matriz como Fibronectina. En estos estudios de qPCR se observó como en los riñones dañados existía un aumento de la expresión génica de estos marcadores, y como el bloqueo de las proteínas BET con JQ1 produjo una disminución significativa de la expresión de estos mediadores (Figura 31).

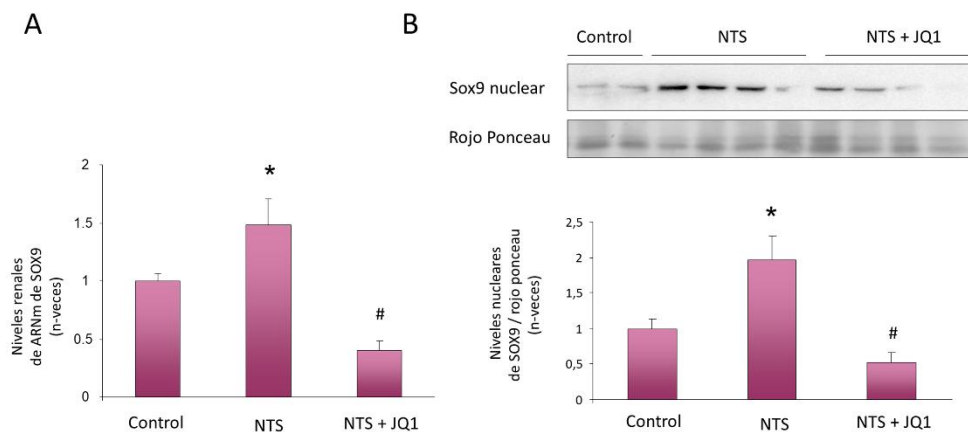


**Figura 31. La inhibición de la función de las proteínas BET disminuye la expresión génica de marcadores fibróticos en un modelo UUO.** Los niveles de Fibronectina, PAI 1 y TGF- $\beta$ , fueron evaluados por técnicas de qPCR en tiempo real. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \* p < 0,05 vs contralateral; #p < 0,05 vs riñones obstruidos tratados con JQ1.



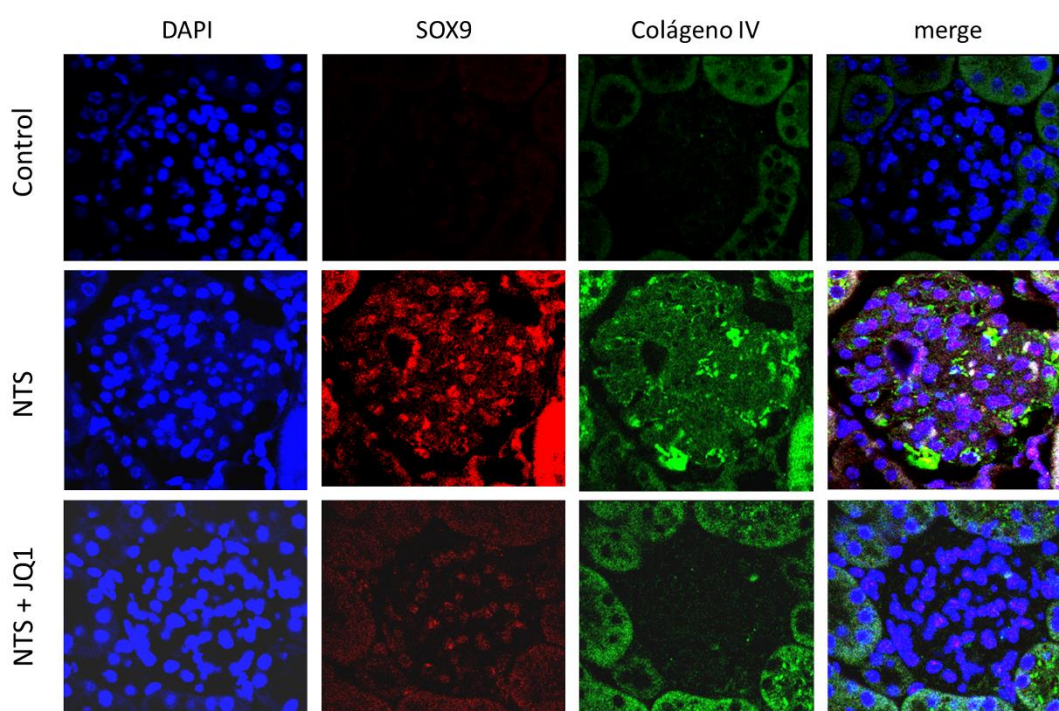
### 4.3- El bloqueo de las proteínas BET regula SOX9 en diferentes modelos de daño renal.

Una de las características principales en el desarrollo de la fibrosis es la acumulación excesiva e inapropiada de matriz extracelular (52). Para entender mejor los mecanismos moleculares implicados en el proceso de síntesis de matriz y el papel que desempeñan las proteínas BET en la fibrosis, quisimos estudiar diferentes rutas de señalización. La proteína implicada en la determinación del sexo Y box 9 (SOX9), es una proteína involucrada en el desarrollo de diferentes órganos como el riñón (136), (137). Bennet y colaboradores en un estudio de expresión génica mediante microarrays, mostró una elevada expresión de SOX9 en glomérulos enfermos (138). Por otro lado, estudios en células mesangiales han mostrado como SOX9 se regula en presencia de TGF- $\beta$ 1 para activar la transcripción de Colágeno IVa2 (66). Debido a estos antecedentes, quisimos estudiar el papel que juega SOX9 en el proceso fibrótico asociado a la patología renal y su relación con las proteínas BET. En primer lugar se evaluaron los niveles de SOX9 en el modelo de nefritis inmune de 10 días, y se observó que tanto los niveles de ARNm (Figura 32A), como los niveles nucleares de SOX9 (Figura 32B) estaban aumentados de forma significativa, y como el bloqueo de las funciones de las proteínas BET mediante JQ1 disminuyó a niveles basales los niveles de SOX9.



**Figura 32. El tratamiento con JQ1 inhibe la expresión y los niveles nucleares de SOX9 en un modelo de nefritis inmune.** Los niveles de SOX9 fueron evaluados por qPCR en tiempo real (A), y mediante técnica de western blot en extractos nucleares (B) del modelo de nefritis inmune por NTS. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo. \* $p < 0.05$  vs control; #  $p < 0.05$  vs NTS.

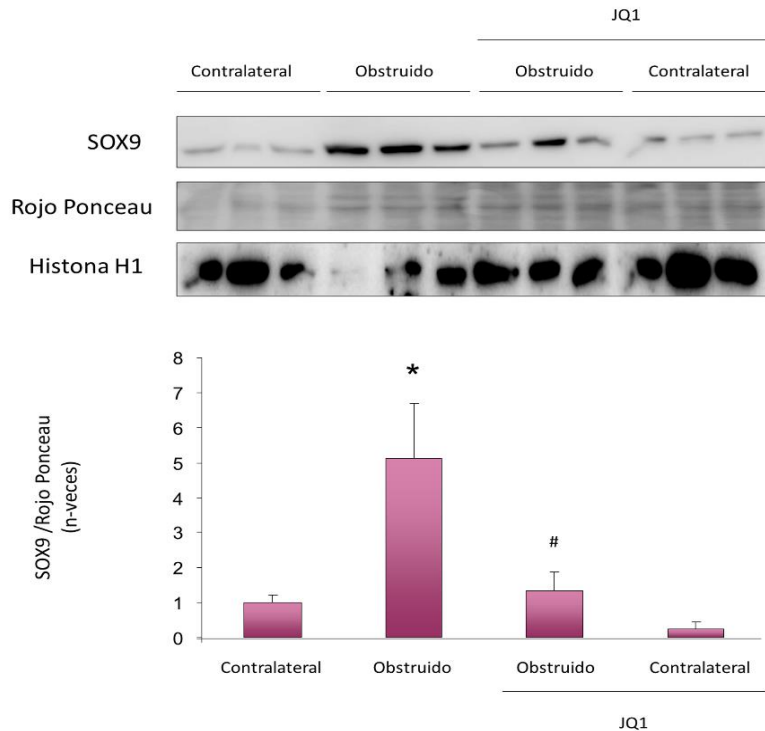
SOX9 es un factor de transcripción que ejerce sus funciones principales en el núcleo de la célula. En extractos nucleares de los riñones dañados del modelo de nefritis inmune NTS, observamos una disminución de los niveles de SOX9. Debido a esto quisimos evaluar la expresión y localización de SOX9 cuando se produce un daño glomerular en el riñón y cómo influye la inhibición de las proteínas BET en su localización y su capacidad para regular la síntesis de componentes de matriz extracelular. Para ello, se realizó un doble marcaje fluorescente para SOX9 y Colágeno IV. En este estudio, se observó que cuando existe un daño de marcado carácter glomerular, SOX9 se trasloca al núcleo de las células del glomérulo y estas células a su vez presentan un aumento de la síntesis de Colágeno IV (colocalización). La inhibición de las proteínas BET con JQ1, produjo una disminución de la presencia nuclear de SOX9 así como una disminución de la expresión de Colágeno IV en esas mismas células. (Figura 33).



**Figura 33. JQ1 inhibe la translocación al núcleo de SOX9 en un modelo de nefritis inmune NTS.** Para evaluar los niveles nucleares de SOX9 se realizó una técnica de doble tinción de inmunofluorescencia de SOX9 y Colágeno IV con dos anticuerpos secundarios fluorescentes diferentes, Alexa 688 y Alexa 488 respectivamente. Los datos están expresados como la media  $\pm$  EEM de 5 -7 animales por grupo. \*p <0.05 vs control; #p <0.05 vs NTS.

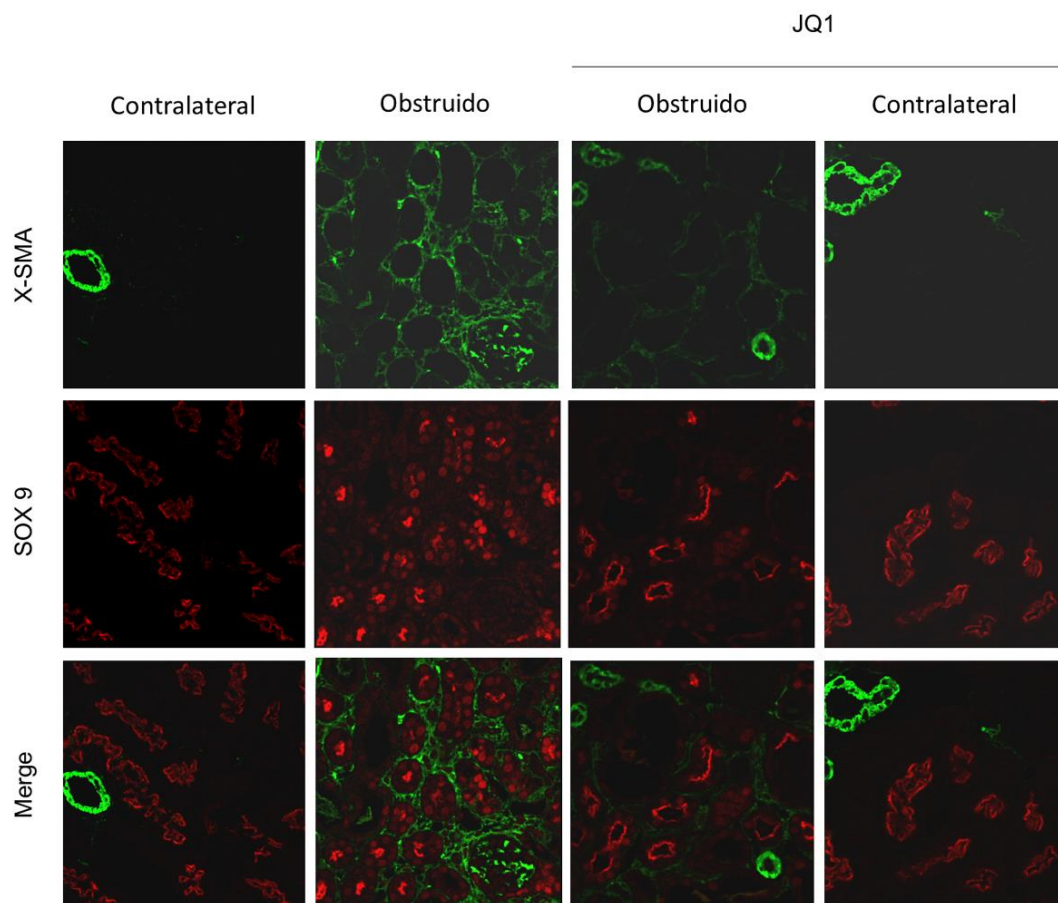
## RESULTADOS

Estos resultados sugieren que SOX9 está regulando el proceso fibrótico en un modelo de nefritis inmune por NTS. Por ello quisimos estudiar el papel de este factor de transcripción en un modelo de obstrucción unilateral del uréter. Para ello, mediante técnicas de western blot analizamos la expresión proteica nuclear de SOX9 en este modelo. Observamos, que los niveles de SOX9, estaban claramente aumentados en los riñones obstruidos. Este aumento se vio disminuido significativamente en aquellos ratones que fueron tratados con JQ1 (Figura 34).



**Figura 34. La inhibición de las proteínas BET produce una disminución en los niveles de SOX9 nuclear en un modelo UUO.** Los niveles proteicos de SOX9 fueron evaluados por western blot. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs riñones obstruidos tratados con JQ1.

Mediante técnicas de inmunofluorescencia, se observó, que en los riñones dañados, SOX9 tenía una marcada localización nuclear específica de las células tubuloepiteliales, expresión que colocaliza con la expresión de  $\alpha$ -actina, que es un componente característico de la matriz extracelular. El tratamiento con JQ1, inhibiendo las proteínas BET produjo una disminución de la translocación de SOX9 al núcleo (Figura 35).



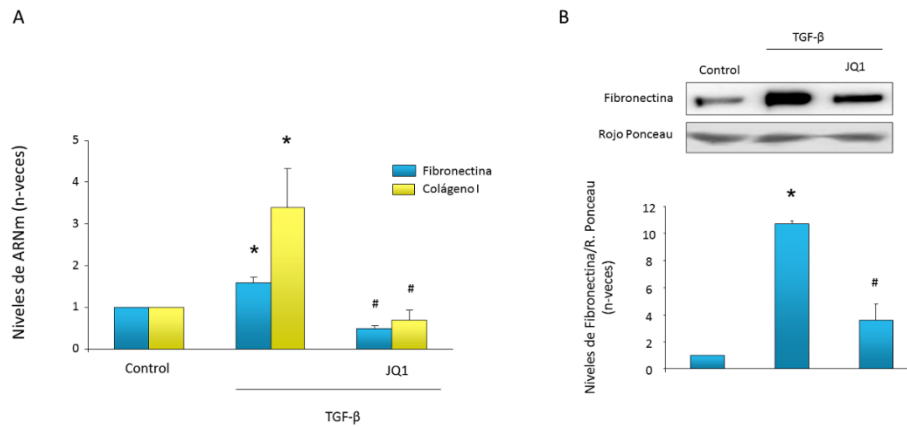
**Figura 35. El bloqueo de las proteínas BET produce una inhibición de la translocación al núcleo de SOX9 en un modelo UUO.** La localización nuclear de SOX9 y su relación con la síntesis de matriz extracelular fue evaluada por técnicas de inmunofluorescencia. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs riñones obstruidos tratados con JQ1.

#### 4.4- El bloqueo de las proteínas BET produce una inhibición de la fibrosis en células en cultivo.

Los resultados obtenidos *in vivo*, muestran que al inhibir la función de las proteínas BET, se produce una disminución de la fibrosis en diferentes modelos de daño renal experimental. Por ello quisimos corroborar estos resultados en experimentos *in vitro* en diferentes líneas celulares en cultivo como la línea de células mesangiales humanas K18 o las líneas de fibroblastos NIH3T3 o TFBs. Con este análisis en células en cultivo, se quiso estudiar la importancia de las proteínas BET en la síntesis y la expresión génica de proteínas de matriz, así como el papel que juega SOX9 en su expresión. En células mesangiales, se analizó cómo su estimulación con el factor profibrótico TGF- $\beta$  produjo un aumento de la expresión génica de las proteínas de matriz, Colágeno I y Fibronectina, así como de la liberación al medio extracelular de Fibronectina.

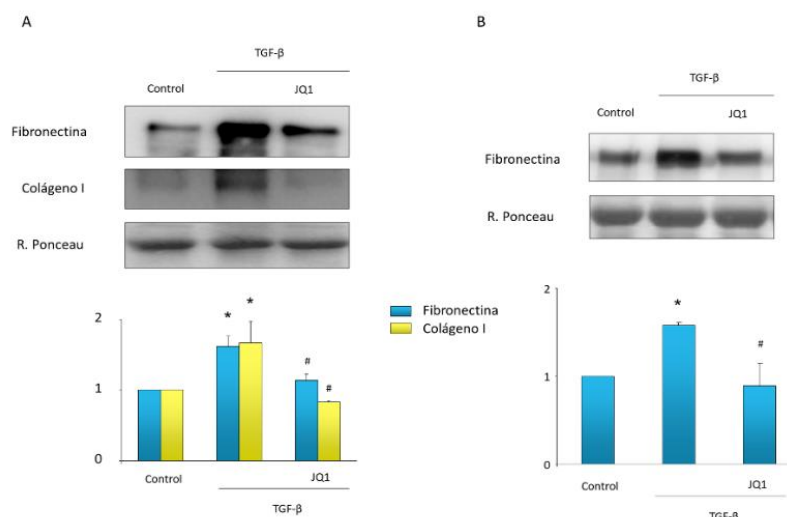
## RESULTADOS

La preincubación de las células con JQ1 disminuyó a niveles basales la expresión del ARNm de estas dos proteínas así como de los niveles proteicos solubles de Fibronectina (Figura 36).



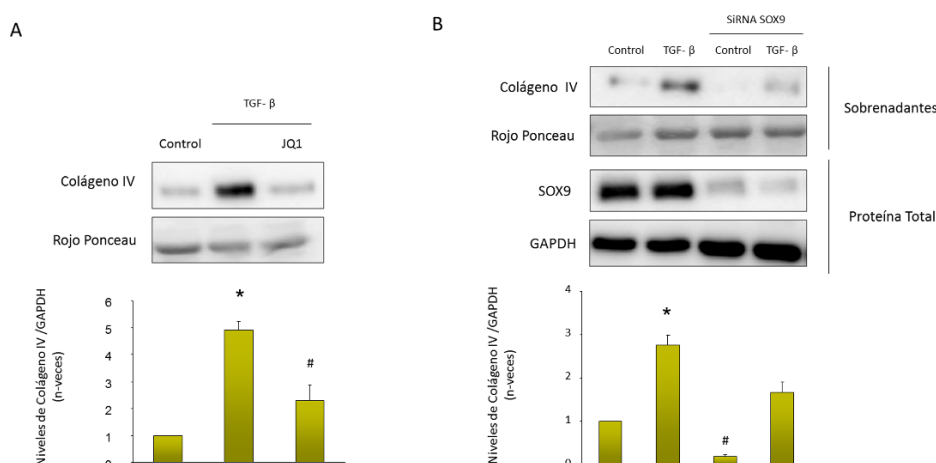
**Figura 36. La presencia de JQ1 inhibe la expresión de Fibronectina y Colágeno I en células mesangiales en cultivo.** Los niveles de Fibronectina y Colágeno I fueron evaluados tanto por qPCR en tiempo real como por western blot. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs control. #  $p < 0,05$  vs células tratadas con TGF- $\beta$ .

Los fibroblastos son células clave en el proceso fibrótico, por ello se quiso estudiar tanto en la línea de fibroblastos embrionarios NIH3T3 como en fibroblastos renales (TFBs), el efecto que tendría el bloqueo de las proteínas BET en la secreción de componentes de matriz extracelular. En estos estudios se observó como las células estimuladas con TGF- $\beta$  durante 48 horas aumentaron significativamente los niveles proteicos de Fibronectina y Colágeno I. Los niveles proteicos de estas proteínas de matriz se vieron significativamente disminuidos en las células que habían sido tratadas previamente con el inhibidor de proteínas BET, JQ1 (Figura 37 A y B).



**Figura 37. El tratamiento con JQ1 inhibe la expresión de Fibronectina y Colágeno Tipo I inducida por TGF-β en fibroblastos murinos tanto embrionarios (NIH3T3) como renales (TFBs).** Las células se pretrataron con JQ1 a una concentración de 5  $\mu$ M durante 1 hora y se estimularon con 10 ng/ml de TGF-β durante 48 horas. Los niveles proteicos de Fibronectina y Colágeno Tipo I fueron evaluados por técnicas de western Blot en fibroblastos renales TFBs (A) y en fibroblastos embrionarios NIH3T3 (B). Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. \* p < 0,05 vs control # p < 0,05 vs células tratadas con TGF-β.

Posteriormente quisimos medir los niveles de Colágeno IV, en células mesangiales humanas de la línea K18 para analizar como afectaba el bloqueo de las proteínas BET así como el silenciamiento génico de SOX9, a la síntesis de componentes de matriz en células glomerulares. Se observó que tanto el bloqueo farmacológico de las proteínas BET con JQ1 (Figura 38 A), como el silenciamiento génico de SOX9 (Figura 38 B), consiguió inhibir la fibrosis disminuyendo la síntesis de Colágeno IV.

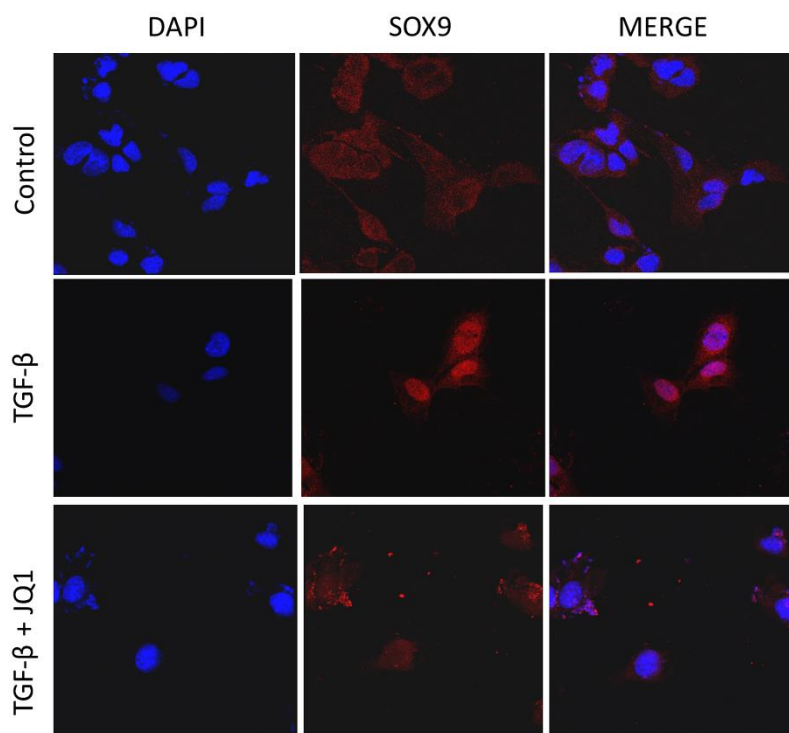


**Figura 38. El tratamiento con JQ1 así como el silenciamiento génico de SOX9 inhiben la expresión de Colágeno VI en células mesangiales humanas K18.** Los niveles proteicos de Colágeno VI fueron evaluados por técnicas de western blot. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. \* p < 0,05 vs control # p < 0,05 vs células tratadas con TGF-β.



## RESULTADOS

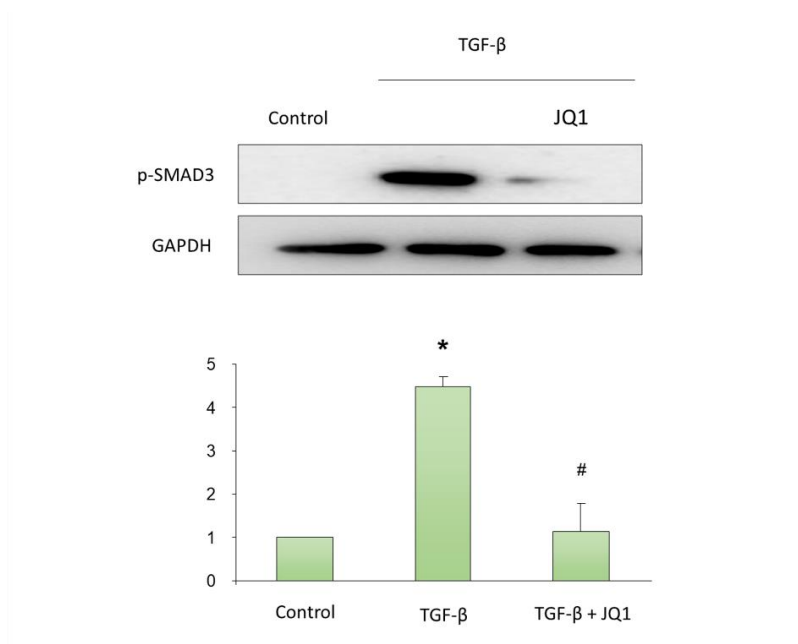
Los resultados obtenidos en el modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO), así como en el modelo de nefritis inmune por suero nefrotóxico NTS, demuestran que la presencia de SOX9 en el núcleo celular (activación de SOX9) colocaliza con las zonas donde se sintetizan componentes de matriz como Colágeno IV o  $\alpha$ -actina, y que JQ1 está inhibiendo su translocación al núcleo donde ejerce sus funciones. Debido a estos resultados en los modelos de daño renal quisimos corroborar si estos resultados se podrían extrapolar a estudios en células en cultivo. Por ello estimulamos células mesangiales de la cepa K18, con TGF- $\beta$  durante 48 horas y observamos como TGF- $\beta$  produjo un aumento de la translocación al núcleo de SOX9, y que la inhibición de la función de las proteínas BET con JQ1, generó una disminución de la localización nuclear de SOX9, impidiendo así que ejerza su función (Figura 39).



**Figura 39. El bloqueo de las proteínas BET produce una inhibición de la translocación al núcleo de SOX9 en células mesangiales humanas.** Las células se pretrataron con JQ1 a una concentración de 5  $\mu$ M durante 1 hora y se estimularon con 10 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 48 horas. La localización nuclear de SOX9 se evaluó por técnicas de inmunofluorescencia usando un anticuerpo Alexa 688. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs riñones obstruidos tratados con JQ1.

La activación de la vía de señalización de TGF- $\beta$  regula diversas funciones celulares, incluidas la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y la inflamación (139), (140). Muchos estudios adjudican un papel clave a TGF- $\beta$  en la patogénesis de la fibrosis renal (141).

Se ha descrito que TGF- $\beta$ 1 ejerce su actividad profibrótica a través de la estimulación de la proliferación de fibroblastos, la síntesis de matriz extracelular (por ejemplo, Colágeno tipos I, III y IV, proteoglicanos, laminina y Fibronectina) y la transición epitelio-mesénquima (EMT). La activación de la ruta de TGF- $\beta$  y la activación de las proteínas SMAD2 y SMAD3 en la fibrosis se han estudiado tanto en modelos humanos como animales de enfermedad renal crónica (142). Por ello quisimos estudiar si los inhibidores de proteínas BET como JQ1 eran capaces de modular la activación de la vía de señalización de las proteínas SMAD. En células mesangiales humanas. La estimulación durante 24 horas con TGF- $\beta$  indujo la fosforilación de SMAD3 de forma significativa, fosforilación que fue disminuida a niveles basales en las células q habían sido preincubadas con JQ1 (Figura 40).

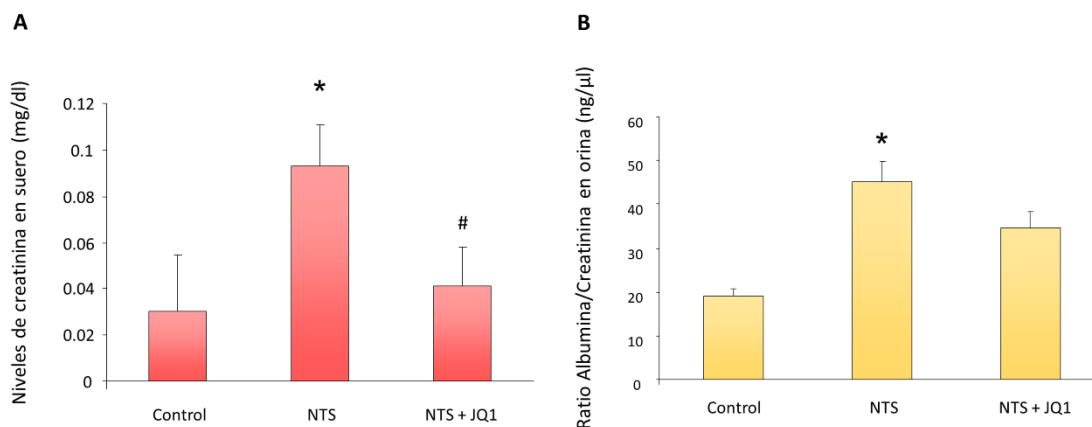


**Figura 40. La inhibición de las proteínas BET produce una disminución de los niveles de p-SMAD3 en células mesangiales en cultivo.** Las células se pretrataron con JQ1 a una concentración de 5  $\mu$ M durante 1 hora y se estimularon con 10 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 24 horas. Los niveles proteicos de p-SMAD3 fueron evaluados por técnicas de western blot. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$  vs control #  $p < 0,05$  vs células tratadas con TGF- $\beta$ .



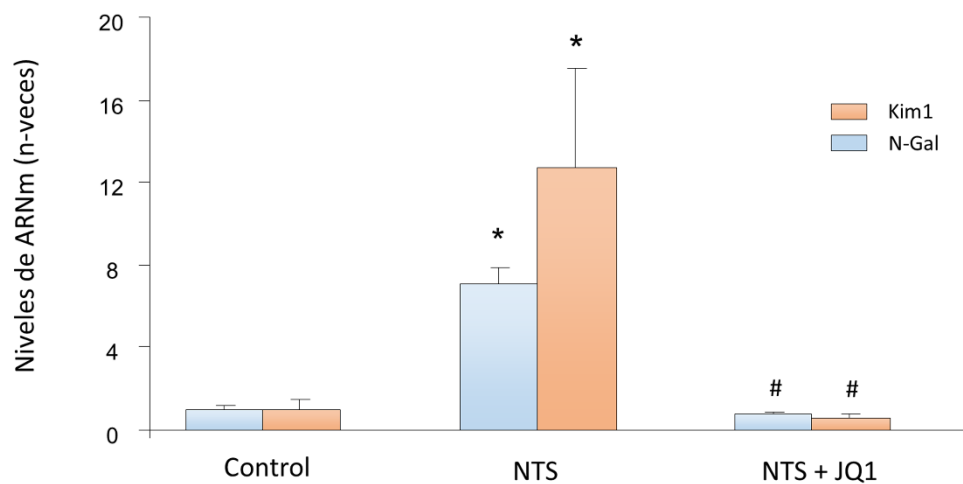
## 5.- La inhibición de proteínas BET mejora la función renal en diferentes modelos de daño renal.

Una de los problemas más graves en la enfermedad renal crónica, es la pérdida de la función renal. En esta tesis se quiso estudiar si el bloqueo de las proteínas BET, podría evitar la pérdida de función renal contribuyendo a ralentizar los efectos deletéreos de la patología que pueden desembocar en un fallo renal terminal. El modelo de nefritis inmune por la administración de un suero anti-membrana basal glomerular NTS se caracteriza por una pérdida de función renal a los 10 días incluyendo la creatinina sérica y la aparición de proteinuria en orina (143). Para determinar la función renal se midieron parametros clasicos en suero y orina (Figura 41 A y B). Se observó como el tratamiento con JQ1, produjo una disminución tanto de creatinina en suero como del ratio albumina/creatinina en orina. Si bien es cierto que solo en el caso de los niveles de creatinina en suero experimenta una bajada significativa, en el caso de la albumina/creatinina en orina muestra una tendencia a recuperar los niveles normales.



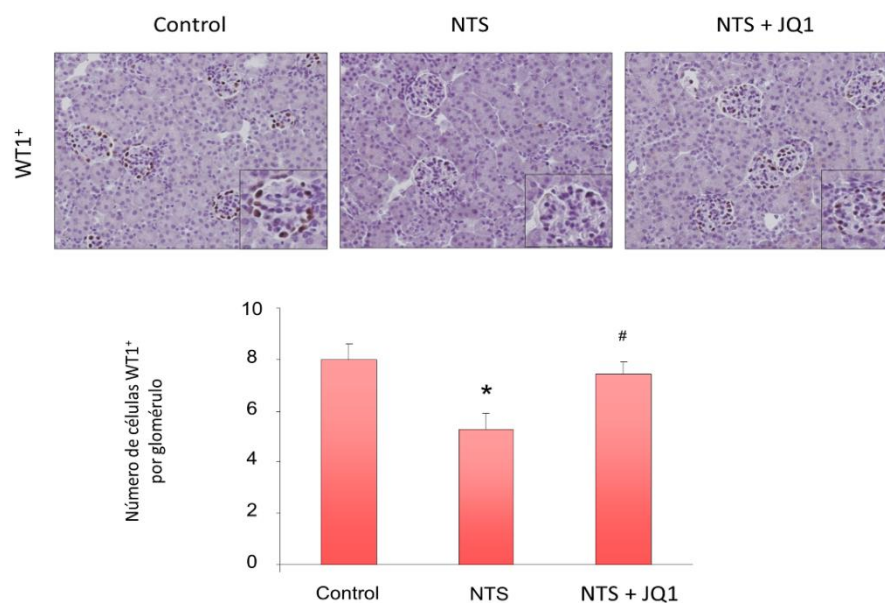
**Figura 41. El tratamiento con JQ1 mejora la función renal en un modelo de nefritis inmune causada por un suero NTS.** En la gráfica se muestra los niveles de creatinina en suero (A) y el ratio de albumina frente a creatinina en orina (B). Los datos están expresados con una media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs control; #  $p < 0.05$  vs NTS.

En el daño renal producido por un suero NTS, la expresión génica de dos marcadores de daño renal como son N-Gal y Kim1 también estaban aumentados. El tratamiento con JQ1 produjo una disminución significativa en la expresión del ARNm de estos dos marcadores (Figura 42).



**Figura 42. El bloqueo de las proteínas BET disminuye la expresión de Kim1 y N-Gal en un modelo de nefritis inmune por NTS.** La expresión de los biomarcadores de daño renal Kim1 y N-Gal, fueron evaluados por qPCR en tiempo real. Los datos están expresados con una media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs control; #  $p < 0.05$  vs NTS.

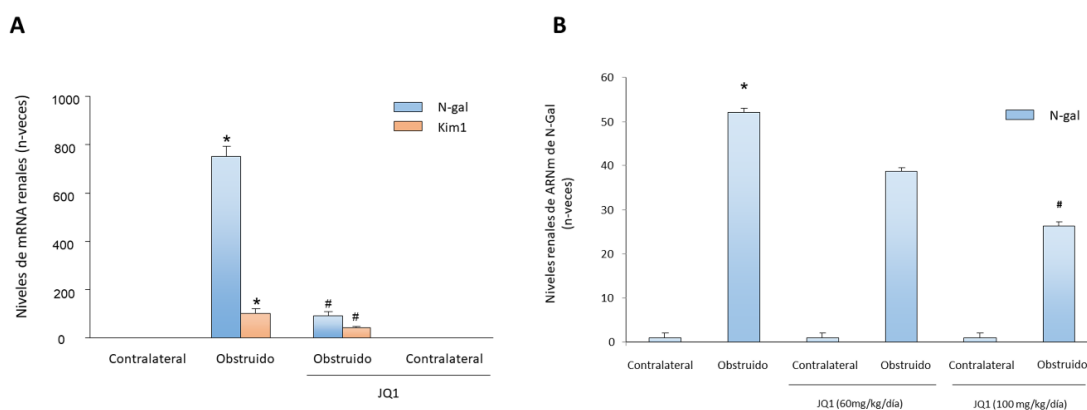
Observamos también un descenso del marcador  $WT1^+$ , el cual corresponde a una proteína de unión al ADN, y es importante durante la formación del tracto urogenital, especialmente en el epitelio que dará origen a los podocitos (144). Pudimos corroborar que el bloqueo de las proteínas BET, normaliza los niveles de células  $WT1^+$  positivas hasta valores controles (Figura 43).



**Figura 43. El tratamiento con JQ1 disminuye el daño podocitario en un modelo de nefritis inmune por NTS.** El marcador  $WT1^+$ , fue evaluado por técnicas de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico para esta proteína. Los datos están expresados con una media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs control; #  $p < 0.05$  vs NTS.

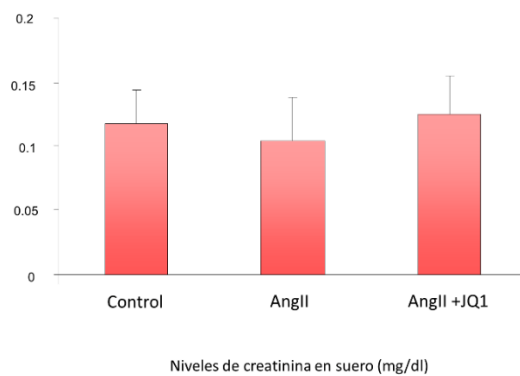
## RESULTADOS

Al observar que tanto N-Gal como Kim1, estaban aumentados en el modelo de daño producido por un suero NTS, se decidió observar estos mismos marcadores en el modelo de UUU. Por pruebas de qPCR en tiempo real, se estudió los niveles de expresión génica de estos dos marcadores, y pudimos observar que en los riñones obstruidos, su expresión estaba significativamente aumentada, y el bloqueo de las proteínas BET, produjo una disminución de ambos marcadores en los riñones dañados. Pudimos observar también como el bloqueo de las proteínas BET, ejerce un efectos dosis dependientes sobre la función renal. Se estudió los niveles de N-Gal, a 60 y a 100 mg/kg/día, siento la dosis de 100, la que produjo una inhibición significativa de la expresión a nivel de ARNm de N-Gal (Figura 44).



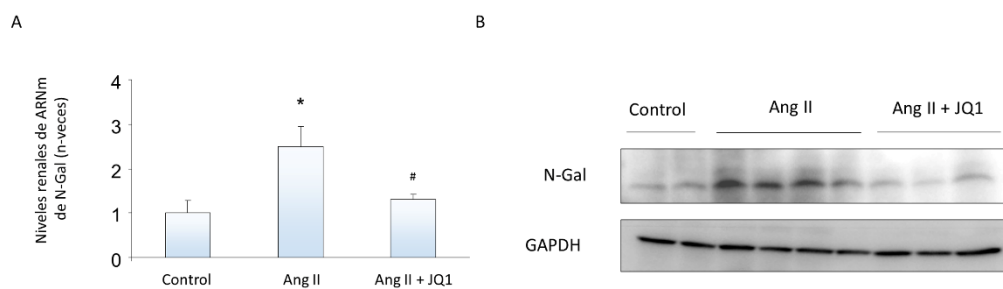
**Figura 44. JQ1 reduce el daño renal en un modelo experimental de obstrucción unilateral del ureter.** Este modelo UUO se realizó en ratones de la cepa C57BL/6 y se estudió después de 5 y 2 días. Algunos ratones se trataron con JQ1 (100 mg/kg/día) (A) y (10 o 60 mg/kg/día) (B) o vehículo (10% de hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina), comenzando 24 horas antes de la obstrucción. Los niveles de ARNm de N-gal y Kim1 fueron evaluados por qPCR en tiempo real. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6-8 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs contralateral; #  $p < 0,05$  vs riñones obstruidos tratados con vehículo.

Para valorar la función renal en el modelo de Ang II, quisimos medir la presencia de creatinina en suero de los ratones a los que se les había sometido a una operación para colocarles la bomba de infusión de Ang II. En ratones inducidos con Ang II no hubo cambios en la función en los niveles de creatinina en suero, en los ratones que fueron tratados con JQ1 (Figura 45).



**Figura 45. Evaluación de la función renal en un modelo de infusión de Ang II.** Se muestran los datos de los niveles de creatinina sérica. Los datos están expresados con una media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo \*p <0.05 vs control; #p <0.05 vs ratones infundidos con Ang II.

A demás, estudiamos los niveles de N-Gal en el modelo de infusión de Ang II, para valorar la función renal en este modelo de daño experimental. Mediante western blot, pudimos observar, como los niveles proteicos están aumentados en los riñones de los ratones infundidos con Ang II, y que el tratamiento con JQ1, disminuye significativamente su expresión (Figura 46).



**Figura 46. En un modelo de Angiotensina II, JQ1, disminuye los niveles de N-Gal.** Los niveles de N-Gal fueron evaluados tanto como por qPCR en tiempo real (A), como por western blot (B). Los datos están expresados con una media  $\pm$  EEM de 5-7 animales por grupo. \* p<0.05 vs control; # p<0.05 vs ratones infundidos con Ang II.

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

### ***La inhibición de las proteínas BET inhibe la respuesta inflamatoria renal al regular la expresión de mediadores inflamatorios.***

Los estudios realizados en esta tesis sugieren que los inhibidores de proteínas BET regulan procesos inflamatorios e inmunes, siendo capaces de disminuir la respuesta inflamatoria en diversos modelos de daño renal experimental y, por tanto, estos compuestos podrían ser una nueva estrategia terapéutica anti-inflamatoria en la enfermedad renal. En estudios realizados *in vitro*, utilizando técnicas de análisis masivo de expresión génica, se observó que en células túbulo-epiteliales renales en un ambiente pro-inflamatorio el inhibidor de proteínas BET JQ1 modula una gran cantidad de genes relacionados con diferentes procesos biológicos, destacando los implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune. Los experimentos *in vivo* realizados en esta tesis en el modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO), caracterizado por daño tubulointersticial, en el modelo de administración sistémica de Angiotensina II asociado a aumento de la presión sanguínea, y en el modelo inmune de daño por administración de suero anti-membrana basal glomerular, demuestran que el tratamiento con el inhibidor de BRD4 JQ1, disminuyó la presencia de células inflamatorias infiltrantes en el riñón, lo cual se asocia a la inhibición de la expresión génica de diversos mediadores pro-inflamatorios. Estos resultados sugieren que los inhibidores BET podrían ser utilizados como tratamientos anti-inflamatorios en enfermedades renales.

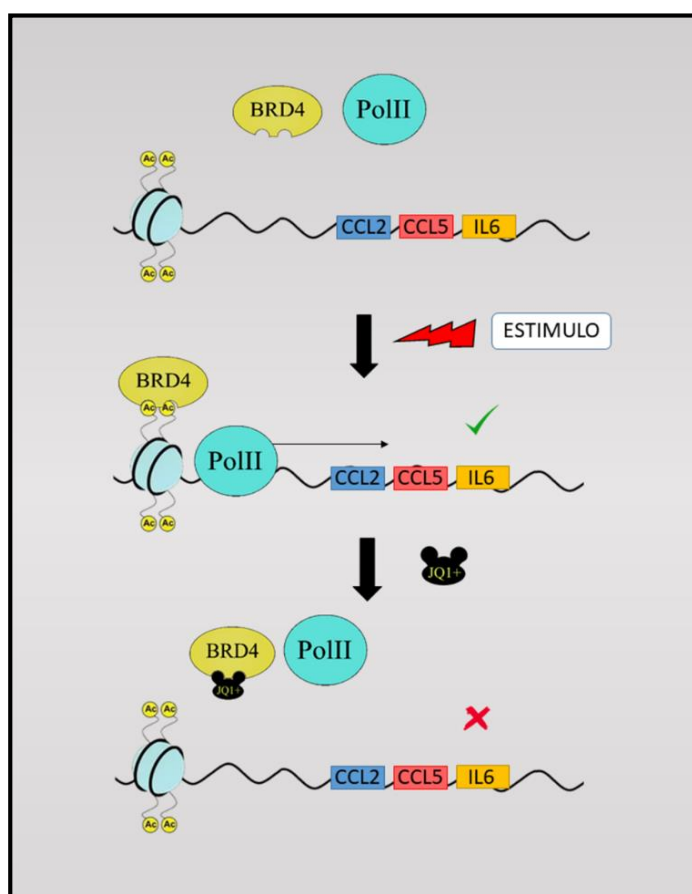
Varios estudios realizados *in vitro* sugieren que los inhibidores BET regulan procesos inflamatorios. En macrófagos activados se ha descrito que el tratamiento con JQ1 o I-BET reduce la expresión de genes inflamatorios en respuesta a lipopolisacárido (145), (146). En fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, I-BET 151 suprime factores pro-inflamatorios y disminuye su capacidad de reclutar células inmunes (147). Los resultados de esta tesis llevados a cabo en células tubuloepiteliales, confirman que varios inhibidores BET, incluido JQ1, inhiben genes claves en procesos inflamatorios, incluido CCL2, fundamental en la regulación del reclutamiento de células inflamatorias en el riñón (148). Además, se demuestra que la inhibición de BRD4, usando silenciamiento génico, regula varios mediadores inflamatorios, como CCL2, CCL5 e IL6. Cada vez se describen más patologías en las cuales los inhibidores BET mejoran las lesiones regulando la respuesta inflamatoria e inmune. En un modelo murino de artritis inducida por Colágeno, JQ1 reduce la respuesta inflamatoria y el daño articular (149). En un modelo de periodontitis en ratón JQ1 suprime significativamente la expresión de citoquinas inflamatorias (150).

Por otra parte, el tratamiento con JQ1 redujo la esplenomegalia y la neuroinflamación en el cerebro mediante una reducción en la expresión de mediadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$ , CCL2 y Nos2 (151).

***Mecanismo anti-inflamatorio de JQ1: Inhibición de la expresión génica de factores inflamatorios mediante el bloqueo de la unión de BRD4 a lisinas acetiladas en las regiones promotoras de genes bajo el control de p-TEFb.***

Existen cada vez más evidencias que demuestran que el proceso inflamatorio podría estar controlado, en parte, por diferentes mecanismos epigenéticos. Así, se ha descrito que modificaciones como la metilación de la lisina 9 de la histona H3, asociada a promotores de genes pro-inflamatorios, activa la expresión de estos genes en condiciones hiperglicémicas (152). Una de las modificaciones epigenéticas más importantes consiste en la acetilación de lisinas, modificación post-traslacional de carácter reversible (153). En éste sentido, BRD4 es un lector epigenético que al reconocer lisinas acetiladas en histonas y factores de transcripción, juega un papel clave en la regulación de la maquinaria transcripcional. BRD4 recluta el complejo transcripcional P-TEFb (junto con el heterodímero de CDK9 y su ciclina T1, T2 o K) a las regiones promotoras y estimula la transcripción dependiente de la ARN Pol II (95). El oncogene c-Myc fue el primer gen identificado como diana de BRD4 (154), posteriormente se han identificado otras dianas, incluidas citoquinas proinflamatorias (155), (151), (150). Tanto en los experimentos realizados *in vitro* como en los diferentes modelos de daño renal experimental descritos en esta tesis, se demuestra que JQ1 inhibe la expresión génica de factores pro-inflamatorios, como CCL5, CCL2 e IL6, cuya regulación transcripcional es dependiente de la formación del complejo P-TEFb. Mediante ensayos de silenciamiento génico *in vitro* se observó que BRD4 regula la expresión de éstos mediadores pro-inflamatorios. Además, los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina sugieren que en el riñón dañado o en células en condiciones pro-inflamatorias, BRD4 está unido de forma significativamente mayor a los promotores de CCL2, CCL5 e IL6, regulando de forma positiva su transcripción. Además, al bloquear la unión de BRD4 a estas regiones promotoras mediante JQ1, se evita la formación del complejo transcripcional, y por ende la transcripción de estos genes (**figura 1**). Estos datos confirman que JQ1 desplaza a BRD4 y consecuentemente a P-TEFb de las regiones promotoras, dando lugar a una disminución de la elongación vía Pol II y a la activación de genes pro-inflamatorios, mostrando un mecanismo similar al descrito para genes tumorales (156).

Mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, hemos demostrado que el reconocimiento de los residuos acetilados en la histona H3 es importante para la inducción de la expresión génica de estos mediadores inflamatorios, no ocurriendo este hecho en el caso de la histona H4. Nuestros resultados sugieren que JQ1 actúa inhibiendo la unión directa de BRD4 a la histona H3 acetilada en las regiones promotoras de genes proinflamatorios, como CCL2, CCL5 e IL6, lo cual podría indicar que el remodelado de la cromatina es un mecanismo a través del cual la inhibición de proteínas BET mejora la inflamación renal (**Figura 1**).



**Figura 1:** Representación del mecanismo de acción de BRD4, y de su inhibidor JQ1, en la regulación de la expresión génica de citoquinas inflamatorias.

***La inhibición de proteínas BET bloquea la vía de señalización de NF- $\kappa$ B disminuyendo los niveles nucleares de su subunidad p65/RelA.***

Un número creciente de estudios resaltan la importancia de la acetilación de lisinas como un paso clave en la traducción de señales en importantes vías de señalización, como la ruta del factor nuclear NF- $\kappa$ B (157), (158). Estudios realizados en el área de cáncer han demostrado que BRD4 reconoce y se une a la lisina-310 acetilada de la subunidad RelA de NF- $\kappa$ B (127), (159). La activación de la ruta de NF- $\kappa$ B es un mecanismo muy relevante en las enfermedades renales (19).

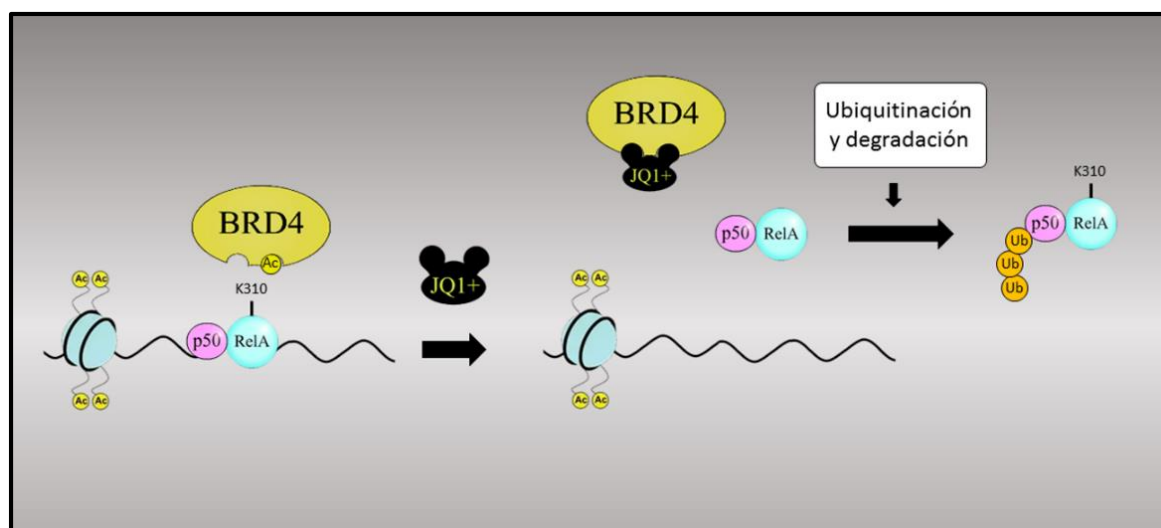


En biopsias de pacientes con enfermedades renales crónicas, como la nefropatía diabética, se ha descrito la activación de la ruta NF- $\kappa$ B asociada a la expresión de mediadores inflamatorios como CCL2 y presencia de células inflamatorias (160).

Muchos datos experimentales han demostrado que el bloqueo de la activación de NF- $\kappa$ B utilizando diversas estrategias farmacológicas, desde inhibidores específicos de la ruta de NF- $\kappa$ B, como fármacos utilizados en clínica, incluidos bloqueantes de Ang II o estatinas, ejercen sus acciones anti-inflamatorias al inhibir la ruta de NF- $\kappa$ B, lo que sugiere que inhibir esta vía de señalización es un mecanismo clave en la modulación de la respuesta inflamatoria renal (19), (161). En los últimos años se ha investigado de forma muy intensa la regulación de esta vía, incluido el papel de las proteínas BET, demostrando que BRD4 es un coactivador de NF- $\kappa$ B (159). Una de las hipótesis de esta tesis es que el bloqueo de esta interacción causado por JQ1 podría inhibir la inflamación renal mediada por la activación de la vía de NF- $\kappa$ B. Los estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en esta tesis muestran que JQ1 disminuye los niveles nucleares de RelA y, por tanto, la actividad transcripcional dependiente de NF- $\kappa$ B, revelando un mecanismo independiente del remodelado de cromatina implicado en las acciones anti-inflamatorias de los inhibidores BET en el daño renal experimental.

Existen evidencias que sugieren que la acetilación reversible de la subunidad RelA de NF- $\kappa$ B juega un papel importante en el control de las funciones de este factor de transcripción en condiciones fisiopatológicas (162), (163). Se ha descrito que en el núcleo la acetilación de la lisina 310 de RelA permite su unión a BRD4, a través de sus dos bromodominios, BD1 y BD2 (127), (128). Esta unión de RelA a BRD4 lo estabiliza, y por tanto, podría activar la transcripción génica dependiente de NF- $\kappa$ B. Por el contrario, la desacetilación de la lisina 310 de RelA favorece su metilación (mediada por Set9) proceso que desencadena su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma (164). Es posible que la unión de la lisina-310 acetilada al bolsillo de unión de los bromodominios de BRD4 pueda bloquear el acceso de las desacetilasas encargadas de deacetilar esta lisina, prolongando así la señal de acetilación y la actividad de NF- $\kappa$ B. Se ha descrito que en patologías proliferativas existe una activación constitutiva de NF- $\kappa$ B, siendo esta activación una característica muy marcada en células cancerosas (165), (166), (167). Así, en el cáncer de pulmón el RelA hiperacetilado en la lisina-310, es responsable de la activación sostenida de NF- $\kappa$ B y, por tanto, de la proliferación descontrolada de las células tumorales (168). Los experimentos *in vitro* realizados en esta tesis muestran que en respuesta a estímulos inflamatorios, JQ1 sólo disminuye los niveles nucleares de RelA, sin afectar a los niveles basales o a la fosforilación de proteínas de la ruta NF- $\kappa$ B, como RelA o I- $\kappa$ B en el citosol. En resumen (**figura 2**), estos datos sugieren que JQ1 actúa a nivel nuclear, desplazando la unión de BRD4 de RelA acetilado y permitiendo que se degrade vía proteasoma (por metilación y

ubiquitinación), lo que causa una disminución de sus niveles, como se ha observado en los riñones dañados en todos modelos estudiados en esta tesis, y la consiguiente inhibición de la expresión génica mediada por NF- $\kappa$ B.



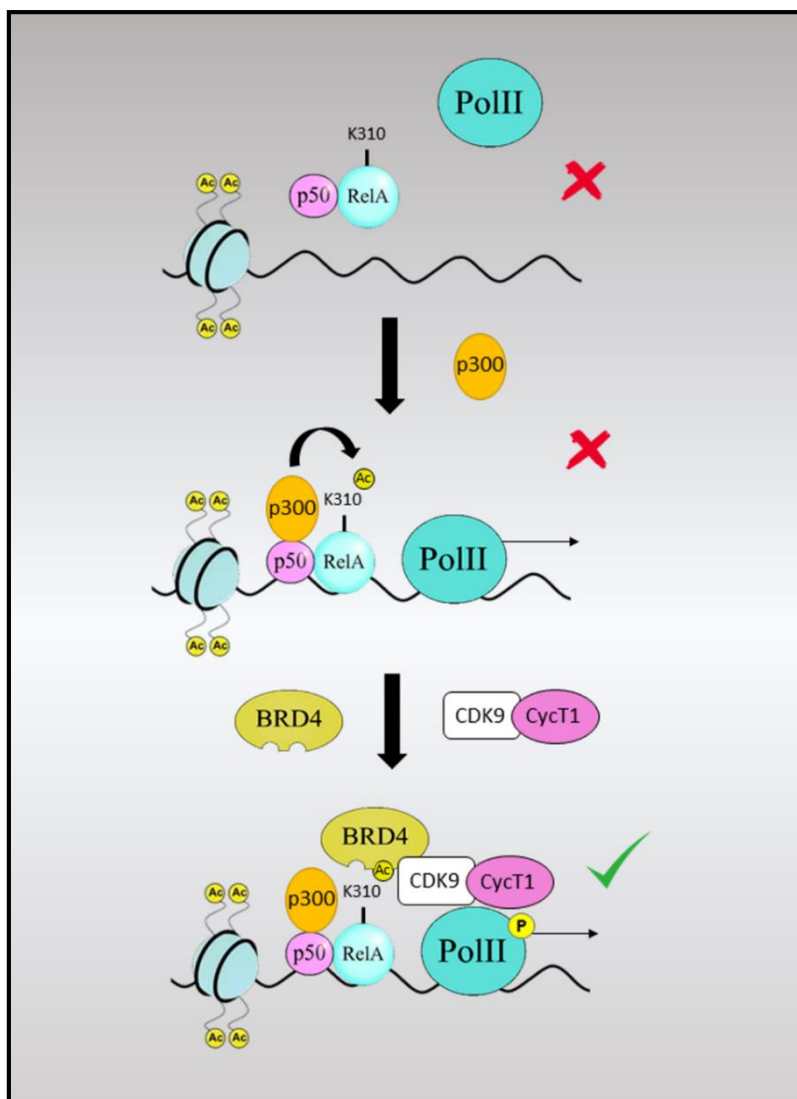
**Figura 2:** Mecanismos por el cual RelA se ubiquitina y se degrada en presencia de JQ1. La unión de BRD4 a la lisina 310 acetilada lo estabiliza e impide que se metile, propiciándose así su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma.

El estudio de expresión del genoma completo en células túbuloepiteliales estimuladas con TNF- $\alpha$  muestra que JQ1 inhibe un gran conjunto de genes que regulan procesos inflamatorios e inmunes. Muchos de estos genes tienen una región TATA en el núcleo de su promotor (por ejemplo: CCL2, CCL5, CCL20, IL-6 e IL8), y, como se ha demostrado anteriormente, JQ1 desplaza la unión de BRD4 y consecuentemente a P-TEFb de la región promotora, lo cual desemboca en una disminución de la elongación producida por la Pol II y de su activación transcripcional. Por otro lado, muchos de los genes inhibidos por JQ1, como LTB, CSF2, MMP9, y CCND, son independientes de P-TEFb al carecer de la secuencia TATA pero están bajo en control del NF- $\kappa$ B, mecanismo que estaría implicado en su inhibición. Además, el análisis de los genes regulados por NF- $\kappa$ B en el modelo experimental de UUU muestra que JQ1 casi abole la expresión de los genes P-TEFb-dependientes (como CCL2, CCL5 e IL6), aunque también disminuye genes P-TEFb independientes (con una inhibición alrededor del 40-50%). Estos datos sugieren que JQ1 inhibe *in vivo* genes controlados por NF- $\kappa$ B independientemente de la presencia del complejo iniciador P-TEFb, debido a la disminución de los niveles nucleares de RelA. Cabe destacar que entre los genes que no se afectan por JQ1 en el estudio de expresión del genoma completo se encuentran muchos componentes de la ruta de NF- $\kappa$ B, incluidos NF- $\kappa$ B1/p50, RelA/p65, NF- $\kappa$ BIA/I $\kappa$ B $\alpha$ , RelB, A20/TNFAIP3 y TNIP1, por tanto JQ1 actúa específicamente sobre el NF- $\kappa$ B activado, al favorecer la degradación nuclear de RelA/p65, por tanto puede proporcionar una nueva estrategia farmacológica para bloquear la activación de esta ruta en enfermedades inflamatorias

## DISCUSIÓN

renales. Esta estrategia podría tener ventajas adicionales a otras opciones anti-inflamatorias que modulan la vía del NF- $\kappa$ B, como inhibidores de quinasas o dianas del proteasoma, al inhibir solo la ruta de NF- $\kappa$ B (por acetilación) y no a otros componentes de la ruta.

Las proteínas acetil-transferasas, como por ejemplo p300, juegan un papel importante en la acetilación de lisinas, así como en el reconocimiento de estas lisinas acetiladas. P300 podría estar jugando un importante papel en la regulación del proceso inflamatorio renal ya que sería la encargada de acetilar a RelA en su lisina 310, para que BRD4 pueda reconocerla y así formar el complejo transcripcional junto con P-TEFb. Procesos como la fosforilación podrían ser importantes para el reclutamiento de p300. La fosforilación de RelA en sus serinas 276 y 536 facilita el reclutamiento de p300 y mejora la acetilación de RelA (169), (170). Por lo tanto, la fosforilación y la acetilación parecen formar un mecanismo regulador combinado para crear una cascada de señalización que dicta el orden de reclutamiento de p300 y BRD4 para activar la transcripción. El efecto cooperativo de p300, BRD4 y RelA, parece derivar de la unión secuencial de p300 y BRD4 a RelA, ya que la sinergia depende de la actividad acetil transferasa de p300 y de la acetilación de lisina 310 (171) **(Figura 3)**. Parece confirmado que RelA interactúa con BRD4 en presencia de p300, ya que cuando la acetilación de la lisina 310 se bloquea por mutaciones específicas, la interacción entre BRD4 y RelA se inhibe completamente (127). Son necesarios estudios futuros para demostrar el papel de p300 en la inflamación renal.



**Figura 3.** Mecanismo por el cual p300, RelA y BRD4 interactúan para formar el complejo transcripcional.

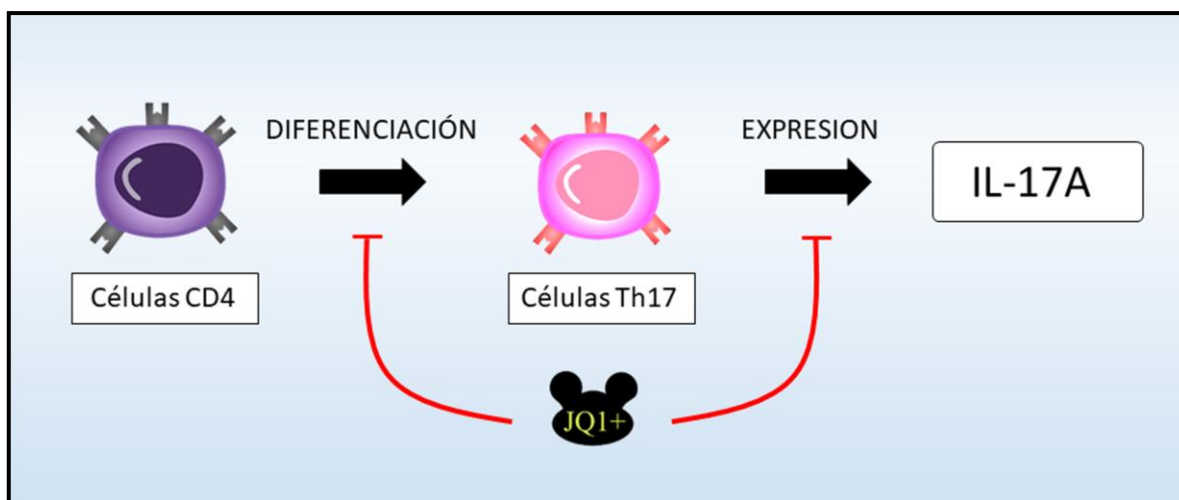
***La inhibición de las proteínas BET disminuye la respuesta inmune mediada por las células Th17.***

La sobreactivación de células T CD4<sup>+</sup> es característica en muchos trastornos autoinmunes. Está descrito que las células Th17, un subconjunto de linfocitos T, responsables de la producción de IL-17A, median en enfermedades autoinmunes como diferentes tipos de esclerosis, psoriasis, artritis reumatoide o enfermedad de Crohn, así como en los modelos murinos que reproducen dichas patologías (172), (173). También existen estudios que demuestran que no sólo es importante la activación de células Th17 en este tipo de enfermedades autoinmunes, sino también en enfermedades inflamatorias crónicas (174), (175).

Estos resultados intensifican la búsqueda de nuevos medicamentos que modulen la producción de IL-17A, la citoquina efectora de la respuesta Th17. Cada vez existen más datos que sugieren que la respuesta Th17 participa en el daño renal crónico, tanto de origen inmune como no inmune (50). Varios trabajos en diversos modelos experimentales de daño renal no inmune, incluidos los realizados por nuestro grupo (administración de CCN2, infusión de Ang II, obstrucción unilateral del uréter y nefropatía diabética) e inmunes (nefritis anti-membrana basal glomerular) han descrito un aumento de la producción de su citoquina efectora IL-17A en el riñón (131). En esta tesis se ha confirmado la presencia de células T que expresan IL-17A (células Th17) por inmunohistoquímica, así como un aumento de la expresión y síntesis de IL-17A en los riñones obstruidos. Además, se ha descrito que el bloqueo de la respuesta Th17, mediante un anticuerpo neutralizante de IL-17A, disminuye las lesiones renales en varios de los modelos indicados arriba (131). Estos datos sugieren que el bloqueo de IL-17A podría ser una buena estrategia terapéutica para la enfermedad renal.

Existen evidencias cada vez más sólidas de la implicación de las proteínas BET en la diferenciación de las células Th17. Publicaciones recientes confirman que en linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD45RA humanos, cultivados en presencia de TGF- $\beta$  e IL6, se induce la diferenciación hacia linfocitos Th17, demostrada por la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ t y de CCR6, y la síntesis de IL-17A e IL22 (133). Sin embargo, en presencia de JQ1 la expresión de los anteriores factores estaba significativamente inhibida, demostrando que la inhibición de las proteínas BET impide la diferenciación Th17 (176). Los resultados expuestos en esta tesis demuestran que el tratamiento con JQ1 prácticamente inhibe los niveles renales de IL-17A en dos modelos experimentales de daño renal no inmune (UUO) e inmune. Existen otros estudios que apoyan el efecto beneficios de la inhibición de las proteínas BET en la supresión de la diferenciación de células CD4<sup>+</sup> a células Th17 en otras patologías (177), como se ha observado en la artritis inducida por Colágeno y en la encefalomielitis autoinmune (176). Por otro lado, las proteínas BET también participan en la regulación de la expresión génica de la citoquina efectora de la respuesta Th17, IL-17A (**Figura 4**). Se ha descrito que p300, un coactivador transcripcional que posee bromodominios y actividad acetilasa, se une al promotor del gen de IL-17A en células murinas Th17, facilitando la accesibilidad a la cromatina (178). BRD4 y BRD2 se unen directamente a la cromatina, a la región reguladora de CNS2 que controla la expresión del gen IL-17A (176). En esta tesis se ha observado un bloqueo de la inducción del gen IL-17A asociada al daño renal en los riñones obstruidos de ratones tratados con JQ1, confirmado el efecto de los inhibidores BET en la regulación de este gen. Además, los resultados de los estudios *in vitro* muestran que otras citoquinas relacionadas con la respuesta Th17, como CCL20 y CSF-1, también fueron inhibidas por JQ1.

En resumen, estos datos expanden las estrategias de neutralización de los efectos inflamatorios mediados por IL-17A en el riñón empleando inhibidores de bromodominios.



**Figura 4:** Mecanismo de acción de JQ1 en la respuesta inmune Th17: está inhibiendo tanto la diferenciación de células CD4 a Th17 como la expresión del gen de IL-17A.

#### **La inhibición de las proteínas BET disminuye la fibrosis renal.**

Un daño persistente en el riñón puede hacer que el proceso normal de reparación tisular falle, y se produzca una cronificación del daño, desembocando en la acumulación de proteínas de matriz extracelular, como Fibronectina y Colágeno I, III y IV (51). Existen estudios que relacionan la fibrosis en diferentes órganos con las acciones de las proteínas BET. Los primeros estudios se realizaron en fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, donde se observó que la inhibición farmacológica de BRD4 con JQ1 produce una inhibición de su migración, proliferación y de la liberación de IL6. Además, en un modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones, JQ1 atenuó sustancialmente la fibrosis (179). En un modelo de daño hepático, la inhibición de proteínas BET con JQ1 disminuyó la fibrosis regulando entre otros procesos la activación de células estrelladas hepáticas y su diferenciación a miofibroblastos (180). En este estudio se demostró que BRD4 está colocalizado con factores de transcripción que regulan genes profibróticos (180). Posteriormente, un análisis funcional reveló que los inhibidores de proteínas BET influyeron en la cantidad de ARN polimerasa II que estaba unida al promotor de Col2a1 (181).

## DISCUSIÓN

Los experimentos *in vitro* realizados en esta tesis en células mesangiales y en fibroblastos, muestran que JQ1 es capaz de inhibir la expresión génica y la producción de varias proteínas de matriz extracelular inducido por TGF- $\beta$ 1, incluidas Fibronectina y Colágeno tipo I y IV, demostrando que la inhibición de proteínas BET tiene un efecto directo sobre la regulación de estas proteínas de matriz extracelular. Resultados similares han sido descritos recientemente en células túbulo epiteliales estimuladas con TGF- $\beta$ 1, donde la inhibición de las funciones de BRD4, por silenciamiento de su gen o el tratamiento con JQ1, da lugar a la disminución de la expresión de genes fibróticos, como  $\alpha$ -actina de músculo liso y Fibronectina (182). Por otro lado, los estudios *in vivo* realizados en esta tesis muestran, que en los modelos de UUO y nefritis inmune, el tratamiento con JQ1 produce una disminución de la fibrosis renal, regulando los niveles de mediadores fibróticos, como TGF- $\beta$  y PAI-1 a nivel de ARNm, así como la acumulación de componentes de matriz extracelular. Estos resultados han sido confirmados por el grupo de Xiong que ha descrito en el modelo UUO cómo el tratamiento con otros inhibidores de proteínas BET, como I-BET 151, disminuye los niveles de proteínas de matriz extracelular, la activación de fibroblastos renales e infiltración de macrófagos (183). Varios estudios confirman los efectos anti-fibróticos de inhibidores BET en diversas patologías. En un modelo murino de hipertrofia cardíaca por ejercicio físico acuático, los análisis transcriptómicos revelaron que JQ1 bloqueaba genes implicados en rutas de señalización TGF- $\beta$ , sin embargo, JQ1 no mejoró la hipertrofia cardíaca (184). El inhibidor BET RVX-297, que presenta selectividad para el bromodominio BRD2, han demostrado disminuir la fibrosis en los modelos de artritis inducida por Colágeno y en encefalomiелitis autoinmune experimental murina, un modelo de esclerosis múltiple humana (185).

Para profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la matriz extracelular por las proteínas BET, estudiamos SOX9, un factor de transcripción con amplias funciones reconocidas en el desarrollo de varios tejidos, incluido el riñón, donde participa en la formación temprana de la nefrona y el uréter (186), (187). En adultos, la transcripción de SOX9 está muy regulada positivamente en la formación del epitelio del tejido urinario tras haber sufrido diferentes tipos de daño, como la exposición a carcinógenos o peróxido de hidrógeno (188). Existen trabajos recientes que demuestran cómo células epiteliales de túbulo proximal, positivas para SOX9, proliferan, se expanden y se diferencian para reemplazar el tejido dañado en una lesión producida por un daño renal agudo (68), (66). En condiciones normales, no existe expresión de SOX9 en el riñón. Se han identificado varias citoquinas y vías de señalización que regulan a SOX9 en diferentes tejidos. En los condrocitos, la señalización de proteínas morfogénicas del hueso (BMP), está involucrada en la regulación de la expresión de SOX9. La supresión del gen del receptor BMP tipo I conduce a una condrodisplasia grave y a la pérdida de SOX9 (189).

TAK1 (Quinasa activadora del Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ ), contribuye a la expresión de SOX9 mediada por BMP2 y es esencial para el desarrollo del cartílago postnatal (190). Muchas publicaciones han demostrado que SOX9 es importante en fibrosis. Por técnicas de secuenciación génica, se ha identificado SOX9 como un regulador transcripcional clave de genes relacionados con la formación de matriz extracelular (191). La pérdida *in vivo* de SOX9 atenuó la respuesta fibrótica cardíaca tras la lesión isquémica (192), (193). Estudios previos han descrito que en la lesión por la obstrucción unilateral del uréter, la expresión de SOX9 aumenta rápidamente y alcanza su punto máximo a las 24 o 48 horas, manteniéndose elevada varias semanas después del daño (66). En esta tesis se ha demostrado que en los riñones obstruidos, aumenta la expresión nuclear de SOX9, y se localiza en el núcleo de células que expresan  $\alpha$ -SMA, marcador de miofibroblastos activados, la principal célula productora de matriz extracelular. Este aumento de SOX9 en los riñones obstruidos se distribuye preferentemente en áreas de fibrosis tubulointersticial, asociado al aumento de Colágeno tipo I. Por otro lado, en el modelo de glomerulonefritis inmune también aumentaron los niveles de SOX9 nucleares, y colocalizó preferentemente a nivel glomerular, asociado a células con tinción positiva para Colágeno tipo IV, el principal componente de la matriz extracelular que aumenta en esta glomerulonefritis inmune. Además, en células mesangiales el silenciamiento génico de SOX9 inhibió la producción de Colágeno tipo IV inducida por TGF- $\beta$ , demostrando que este factor de transcripción regula la producción de proteínas de matriz extracelular en células renales. Los estudios realizados *in vitro* en células mesangiales y en los modelos experimentales han demostrado que el tratamiento con JQ1 inhibe la activación de SOX9 inducida por TGF- $\beta$  o por el daño renal, respectivamente. Estos datos sugieren que los efectos anti-fibróticos de la inhibición de proteínas BET podrían ser debidos a la inhibición del factor de transcripción SOX9.

La vía de señalización de SMAD es clave en la regulación de la fibrosis renal (194). Existen evidencias que indican que la hiperactivación de SMAD3 asociada con la degradación progresiva de SMAD7, la cual es una proteína inhibidora de la activación de esta ruta, es una característica clave de las enfermedades fibróticas, y se ha hipotetizado que el desequilibrio entre SMAD3 y SMAD7 podría ser uno de los principales mecanismos de regulación en la respuesta fibrótica (195), (196). En células mesangiales humanas, pudimos observar que la estimulación durante 24 horas con TGF- $\beta$  indujo la fosforilación de SMAD3 de forma claramente significativa, fosforilación que fue disminuida a niveles basales en las células que habían sido preincubadas con JQ1. Existen estudios recientes que confirman estos datos, donde JQ1 atenuó la fibrosis y la respuesta inflamatoria consecuentes de la radiación usada en radioterapia en cáncer torácico, al suprimir BRD4, c-MYC, Colágeno I, TGF- $\beta$ , p65, p-SMAD2 y p-SMAD3 después de la irradiación (197).



Estos datos sugieren que la vía SMAD está modulada por proteínas BET, mostrando otro mecanismo implicado en la regulación de la fibrosis renal.

### ***La inhibición de las proteínas BET mejora la función renal en modelos experimentales de daño renal.***

La pérdida de función renal es uno de los problemas más importantes en la enfermedad renal crónica. Nuestros resultados han demostrado que el bloqueo de las proteínas BET puede evitar la pérdida de función renal ralentizando los efectos negativos de la patología. En esta tesis, el estudio de la función renal realizado en el modelo murino de glomerulonefritis inmune, mostró que el tratamiento con JQ1 mejora la función renal, sugiriendo que este tratamiento podría ser una nueva opción terapéutica en la enfermedad renal. La pérdida de podocitos es un evento clave asociado a la presencia de proteinuria o albuminuria. En los ratones con glomerulonefritis inmune, la expresión del marcador de podocitos WT-1, estaba muy disminuida y se normalizaba en respuesta al tratamiento con JQ1, sugiriendo que el efecto protector en podocitos podría ser responsable del efecto beneficioso en la función renal observado por la inhibición de las proteínas BET, aunque los estudios implicados requieren investigaciones futuras. Uno de los principales problemas en las patologías renales es la ausencia de un biomarcador de progresión del daño renal. Entre los potenciales biomarcadores de daño renal destacan las proteínas N-Gal y Kim1. La evaluación de los niveles de estos marcadores en los modelos experimentales que estudiamos en esta tesis, confirmó un aumento de su expresión renal en todos los modelos y una disminución en respuesta al tratamiento con JQ1. Estos datos apoyan la posible utilidad en clínica de la evaluación de sus niveles para determinar el daño renal y las respuestas terapéuticas, aunque son necesarios más estudios para su validación y empleo en pacientes con ERC. Actualmente los inhibidores de proteínas BET se están utilizando en diferentes ensayos clínicos en diferentes patologías proliferativas como el cáncer, con resultados muy prometedores (198), (199), (200). Sin embargo, los estudios en otras enfermedades son más escasos. En este sentido actualmente existen ensayos en marcha, que estudian diferentes iBET en Diabetes, fallo cardíaco y enfermedad renal. Este es el caso de RVX 208, o también llamado Apabetalona. Este inhibidor de proteínas BET está siendo usado a día de hoy en ensayos clínicos para ver sus efectos en pacientes con enfermedades como la obesidad, o con eventos cardiovasculares severos (201), (202). Nuestros resultados preclínicos sugieren que los inhibidores BET podrían ser utilizados en la ERC con potenciales efectos beneficiosos, aunque será necesario esperar a los resultados de los ensayos clínicos que actualmente se están realizando para determinar sus efectos en función renal así como la aparición de potenciales efectos adversos.

## **CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONES:**

***1. La inhibición de los bromodominios BET utilizando JQ1 disminuye la respuesta inflamatoria experimental renal al actuar inhibiendo la expresión génica de diversos mediadores pro-inflamatorios.*** JQ1 actúa por varios mecanismos:

1.1) Bloquea la expresión de genes P-TEFb dependientes al desplazar la unión de BRD4 al complejo transcripcional a través de la unión de esta proteína a residuos acetilados en la histona H3, regulando a nivel de promotor la expresión de genes proinflamatorios (como se ha demostrado para CCL2, CCL5 e IL6).

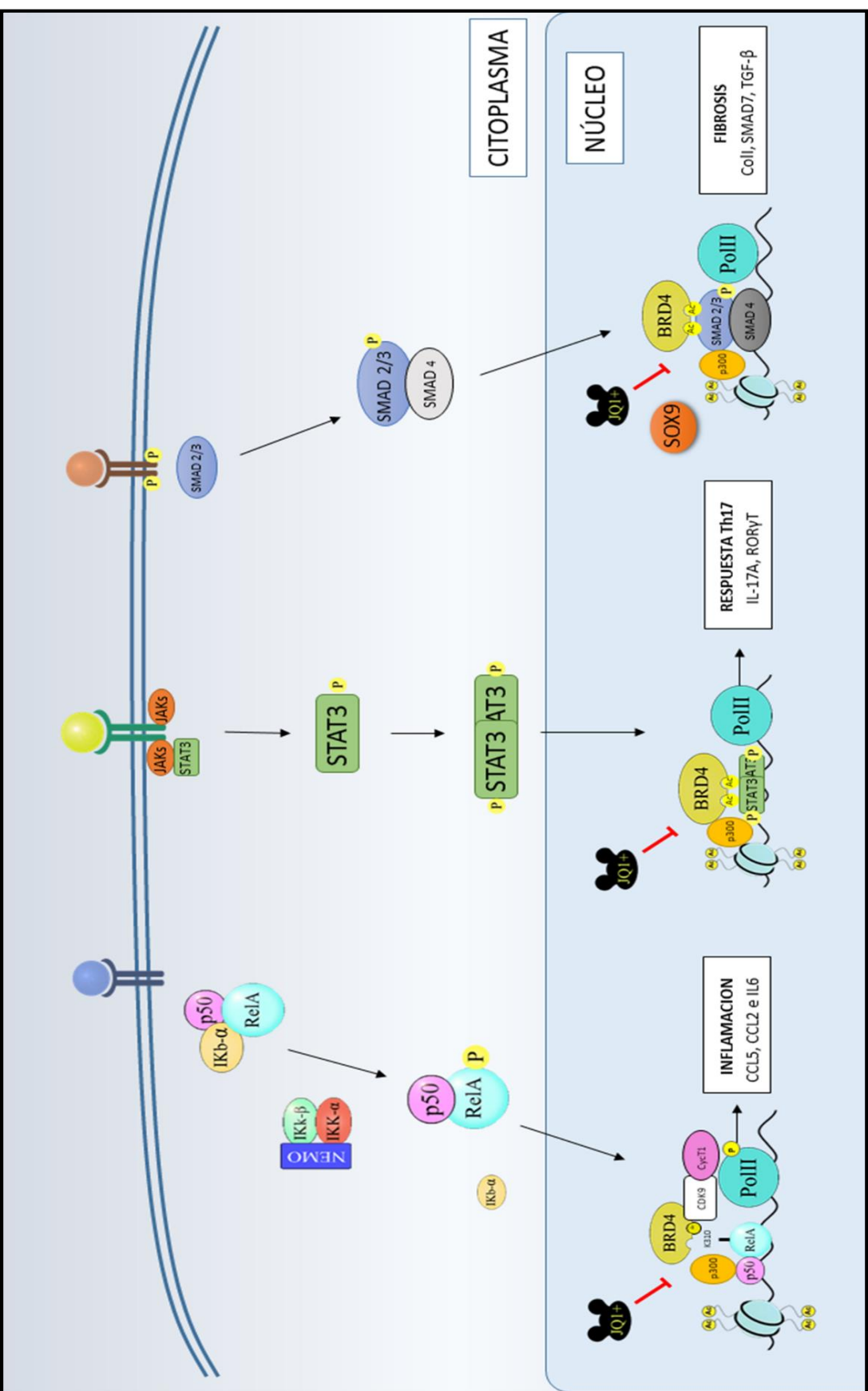
1.2) Inhibe genes p-TEFb independientes controlados por el factor de transcripción NF-κB. JQ1 actúa en el núcleo, donde desplaza la unión de BRD4 de la lisina 310 acetilada de la subunidad p65/RelA del NF-κB, favoreciendo su degradación vía proteosoma, y contribuyendo, por tanto, a disminuir los niveles nucleares de p65.

1.3) Inhibe la respuesta inmune Th17, disminuyendo los niveles renales de la citoquina IL17A.

***2.- La inhibición de los bromodominios BET utilizando JQ1 disminuye la fibrosis renal experimental, regulando la expresión de genes de matriz extracelular (como Colágenos tipo I y IV) y modulando los niveles nucleares de SOX9.***

***3.- La inhibición de los bromodominios BET utilizando JQ1 mejora la función renal en un modelo de glomerulonefritis inmune.***

El tratamiento con inhibidores de las proteínas BET, como JQ1, podría tener importantes aplicaciones terapéuticas al prevenir la inflamación y la fibrosis asociada a la enfermedad renal.



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Hall ME, do Carmo JM, da Silva AA, Juncos LA, Wang Z, Hall JE. Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2014 Feb [cited 2018 Feb 5];7:75–88.
2. Alcázar R, Egocheaga MI, Orte L, Lobos JM, Parra EG, Guisasola FÁ, et al. Documento de consenso SEN-semFYC sobre la enfermedad renal crónica. 2016;273–82.
3. Bolignano et al. The aging kidney revisited: A systematic review. *Ageing Res Rev.* 2014;14(1):65–80.
4. Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int.* 2011;80(12):1258–70.
5. Nitta K, Okada K, Yanai M, Takahashi S. Aging and Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res.* 2013;38(1):109–20.
6. Viau A1, El Karoui K, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K, Pillebout E, Berger T, Mak TW, Knebelmann B, Friedlander G, Barasch J, Terzi F.. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest.* 2010 Nov 1 [cited 2018 Feb 5];120(11):4065–76.
7. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality: a collaborative meta-analysis of general population cohorts. *Lancet.* 2014;375(9731):2073–81.
8. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. 2001;345(12):861–9.
9. Agodoa L et al. 1996. Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. *Lancet.* 1996;349(9069):1857–63.
10. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001 May [cited 2017 Oct 24];10(3):321–9.
11. Alcázar R, Egocheaga MI, Orte L, Lobos JM, González Parra E, Alvarez Guisasola F, Górriz JL, Navarro JF, Martín de Francisco AL. SEN-SEMFYC consensus document on chronic kidney disease. *Nefrologia.* 2008 [cited 2017 Jul 20];28(3):273–82.

## BIBLIOGRAFIA

12. Takase O, Iwabuchi K, Quigg RJ. Immunoregulation of Inflammation in Chronic Kidney Disease. *J Immunol Res*. 2014 [cited 2017 Jul 20];2014:1–2.
13. Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Mar [cited 2018 Feb 1];16 Suppl 1:S83-8.
14. Ferenbach D, Kluth DC, Hughes J. Inflammatory Cells in Renal Injury and Repair. 2007;27(3):250–9.
15. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. 1995. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:827-72.
16. Ebnet K1, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial. 1996; *Annu Rev Immunol*. 1996;14:155-77.
17. Jacobs P, Glorieux G, Vanholder R. Interleukin/cytokine profiles in haemodialysis and in continuous peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(SUPPL. 5).
18. Schindler R. Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(SUPPL. 5):34–40.
19. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. NF-κB in Renal Inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(8):1254–62.
20. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl*. 2002;62(82):S12–22.
21. Wolf M, Sauk J, Shah A, Smirnakis K. A prospective study of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27(1):21–7.
22. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-κB (NF-κB) and renal disease. *Kidney Int*. 2001;59(2):415–24.
23. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, Ruiz-Ortega M, Selgas R, Egido J, Ortiz A. TWEAK activates the non-canonical NF-κB pathway in murine renal tubular cells: Modulation of CCL21. *PLoS One*. 2010;5(1).

24. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Biochem Pharmacol*. 2000;59(1):13–23.
25. Hong HJ1, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2004 Jan 1 [cited 2017 May 22];61(1):159–68.
26. Hayden MS, Ghosh S. Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*. 2008 Feb 8 [cited 2017 May 22];132(3):344–62.
27. Wan F, Lenardo MJ. Specification of DNA Binding Activity of NF- B Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Oct 1 [cited 2017 May 22];1(4):a000067–a000067.
28. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct 30 [cited 2017 May 22];25(51):6680–4.
29. Haas AL. Linear polyubiquitylation: the missing link in NF-kappaB signalling. *Nat Cell Biol*. 2009 Feb [cited 2017 May 22];11(2):116–8.
30. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan [cited 2017 May 22];8(1):49–62.
31. Dorsam G, Krieg RJ, Chan W, Ereso G, Lin KC, Chan JC. Phospholipase A(2) activity, heat shock protein, and superoxide dismutase in rat remnant kidney. *Pediatr Nephrol*. 2000 Feb [cited 2017 May 22];14(2):128–31.
32. McDonald MC, Mota-Filipe H, Paul A, Cuzzocrea S, Abdelrahman M, Harwood S, Plevin R, Chatterjee PK, Yaqoob MM, Thiernemann C . Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. *FASEB J*. 2001 Jan 1 [cited 2017 May 22];15(1):171–86.
33. Phillips MI, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002 Apr [cited 2017 May 22];3(4):569–77.
34. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity*. 2002 Oct [cited 2017 May 22];17(4):525–35.



## BIBLIOGRAFIA

35. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557–69.
36. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol*. 2005 Jul 1 [cited 2017 Jul 25];175(1):5–14.
37. Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med*. 1987 Nov 1 [cited 2017 Jul 25];166(5):1229–44.
38. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*. 2007 Feb [cited 2017 Jul 25];13(2):139–45.
39. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct [cited 2017 Jun 6];9(10):692–703.
40. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkhurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM, Bonneau R, Littman DR. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*. 2012 Oct 12 [cited 2017 Jun 6];151(2):289–303.
41. Kanno Y, Vahedi G, Hirahara K, Singleton K, O’Shea JJ. Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2012 Apr 23 [cited 2017 Jun 6];30(1):707–31. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-020711-075058>
42. Stark GR, Darnell JE. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 2012 Apr 20 [cited 2018 Jan 20];36(4):503–14.
43. Brooks AJ, Waters MJ. The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*. 2010 Sep 27 [cited 2018 Jan 20];6(9):515–25.
44. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123–32.

45. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov 2 [cited 2018 Feb 1];6(11):1123–32.
46. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage. *Nature*. 2006 May 11 [cited 2018 Feb 1];441(7090):231–4.
47. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF $\beta$  in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity*. 2006 Feb [cited 2018 Feb 1];24(2):179–89.
48. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009 Apr [cited 2018 Feb 1];27(1):485–517.
49. Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol*. 2009 Nov [cited 2018 Feb 1];47(1):3–7.
50. Turner J-E, Paust H-J, Steinmetz OM, Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int*. 2010 Jun [cited 2018 Jan 29];77(12):1070–5.
51. Shi-Wen X, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Apr [cited 2018 Feb 1];19(2):133–44.
52. Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney Int Suppl*. 2010 Dec [cited 2017 Jun 6];78(119):S22–6.
53. Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, Saika S, et al. Smad3 is key to TGF- $\beta$ -mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006 Feb [cited 2017 Jun 6];17(1–2):19–27.
54. Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, Masubuchi K, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. C-Jun-NH<sub>2</sub> -Terminal Kinase Mediates Expression of Connective Tissue Growth Factor Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Human Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Jun [cited 2017 Jul 26];28(6):754–61.

55. Carvajal G, Rodríguez-Vita J, Rodrigues-Díez R, Sánchez-López E, Rupérez M, Cartier C, Esteban V, Ortiz A, Egido J, Mezzano SA, Ruiz-Ortega M Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int.* 2008 Sep [cited 2017 Jul 26];74(5):585–95.
56. Liu X. A possible role for intracellular GSH in spontaneous reaction of a cysteine (T338C) engineered into the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *BioMetals.* 2008 Jun 12 [cited 2017 Jul 26];21(3):277–87.
57. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature.* 1994 Aug 4 [cited 2018 Jan 19];370(6488):341–7.
58. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003 Jun 13 [cited 2018 Jan 19];113(6):685–700.
59. Meng X-M, Chung ACK, Lan HY. Role of the TGF- $\beta$ /BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci (Lond).* 2013 Feb 1 [cited 2018 Jan 19];124(4):243–54.
60. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int.* 1996 Feb [cited 2018 Jan 19];49(2):461–9.
61. Bottinger EP. TGF- $\beta$  Signaling in Renal Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Oct 1 [cited 2018 Jan 19];13(10):2600–10.
62. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX Family of Developmental Transcription Factors Based on Sequence and Structural Indicators. *Dev Biol.* 2000 Nov 15 [cited 2017 Aug 24];227(2):239–55.
63. Pritchett J, Athwal V, Roberts N, Hanley NA, Hanley KP. Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: lessons from development. *Trends Mol Med.* 2011 Mar [cited 2017 Dec 13];17(3):166–74.

64. Pritchett J, Harvey E, Athwal V, Berry A, Rowe C, Oakley F, Moles A, Mann DA, Bobola N, Sharrocks AD, Thomson BJ, Zaitoun AM, Irving WL, Guha IN, Hanley NA, Hanley KP. Osteopontin is a novel downstream target of SOX9 with diagnostic implications for progression of liver fibrosis in humans. *Hepatology*. 2012 Sep [cited 2017 Dec 13];56(3):1108–16.
65. Kang HM, Huang S, Reidy K, Han SH, Chinga F, Susztak K. Sox9-Positive Progenitor Cells Play a Key Role in Renal Tubule Epithelial Regeneration in Mice. *Cell Rep*. 2016;14(4):861–71.
66. Kumar S, Liu J, Pang P, Krautzberger AM, Reginensi A, Akiyama H, Schedl A, Humphreys BD, McMahon AP. Sox9 Activation Highlights a Cellular Pathway of Renal Repair in the Acutely Injured Mammalian Kidney. *Cell Rep*. 2015 Aug 25 [cited 2017 Dec 18];12(8):1325–38.
67. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Oct [cited 2017 Aug 24];14(10):2534–43.
68. Kang HM, Huang S, Reidy K, Han SH, Chinga F, Susztak K. Sox9-Positive Progenitor Cells Play a Key Role in Renal Tubule Epithelial Regeneration in Mice. *Cell Rep*. 2016 Feb 2 [cited 2018 Jan 1];14(4):861–71.
69. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol*. 2012 Feb [cited 2017 Jul 27];41(1):10–3.
70. Wu Ct, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*. 2001 Aug 10 [cited 2017 Jul 27];293(5532):1103–5.
71. Morgan DK, Whitelaw E. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm Genome*. 2008 Jun 29 [cited 2017 Jul 27];19(6):394–7.
72. Wang Y, Liang Y, Lu Q. MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin Genet*. 2008 Aug 18 [cited 2017 Jul 27];74(4):307–15.
73. Bártová E, Krejčí J, Harničarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *J Histochem Cytochem*. 2008 Aug 14 [cited 2017 Jul 27];56(8):711–21.
74. D. Nelson MC. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2013; ISBN 1-429.

## BIBLIOGRAFIA

75. Pogna EA, Clayton AL, Mahadevan LC. Signalling to chromatin through post-translational modifications of HMGN. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan [cited 2017 Jul 28];1799(1–2):93–100.
76. Ocampo J, Cui F, Zhurkin VB, Clark DJ. The proto-chromatosome: A fundamental subunit of chromatin? *Nucleus*. 2016 Jul 3 [cited 2017 Aug 16];7(4):382–7.
77. Morgan DK, Whitelaw E. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm Genome*. 2008 Jun 29 [cited 2017 Aug 16];19(6):394–7.
78. Wang Y, Liang Y, Lu Q. MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin Genet*. 2008 Aug 18 [cited 2017 Aug 16];74(4):307–15.
79. Zhang G, Pradhan S. Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life*. 2014 Apr [cited 2017 Aug 16];66(4):240–56.
80. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001 Aug 10 [cited 2017 Aug 16];293(5532):1074–80.
81. Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Oct 15 [cited 2017 Aug 18];15(11):703–8.
82. Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol*. 2013 Mar 5 [cited 2017 Aug 18];20(3):259–66.
83. Radwan M, Serya R. Fragment-Based Drug Discovery in the Bromodomain and Extra-Terminal Domain Family. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2017 Aug [cited 2017 Aug 18];350(8):1700147.
84. Lochrin SE, Price DK, Figg WD. BET bromodomain inhibitors. A novel epigenetic approach in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014 Dec 2 [cited 2017 Aug 18];15(12):1583–5.
85. de la Cruz X, Lois S, Sánchez-Molina S, Martínez-Balbás MA. Do protein motifs read the histone code? *BioEssays*. 2005 Feb [cited 2017 Aug 19];27(2):164–75.
86. Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA.. *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*. 1992 Feb 7 [cited 2017 Aug 19];68(3):561–72.

87. Haynes SR, Dollard C, Winston F, Beck S, Trowsdale J, Dawid IB. The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res.* 1992 May 25 [cited 2017 Aug 19];20(10):2603.
88. Jeanmougin F, Wurtz JM, Le Douarin B, Chambon P, Losson R. The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci.* 1997 May [cited 2017 Aug 19];22(5):151–3.
89. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature.* 1999 Jun 3 [cited 2017 Aug 19];399(6735):491–6.
90. Sanchez R, Meslamani J, Zhou M-M. The bromodomain: From epigenome reader to druggable target. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2014 Aug [cited 2017 Aug 19];1839(8):676–85.
91. Zeng L, Zhou M-M. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* 2002 Feb 20 [cited 2017 Aug 19];513(1):124–8.
92. Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, Keates T, Lambert JP, Barsyte-Lovejoy D, Felletar I, Volkmer R, Müller S, Pawson T, Gingras AC, Arrowsmith CH, Knapp S. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell.* 2012 Mar 30 [cited 2017 Aug 19];149(1):214–31.
93. Jiang YW, Veschambre P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Conaway JW, Conaway RC, Kornberg RD. Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways. *Pnas.* 1998;95(July):8538–43.
94. Floyd SR, Pacold ME, Huang Q, Clarke SM, Lam FC, Cannell IG, Bryson BD, Rameseder J, Lee MJ, Blake EJ, Fydrych A, Ho R, Greenberger BA, Chen GC, Maffa A, Del Rosario AM, Root DE, Carpenter AE, Hahn WC, Sabatini DM, Chen CC, White FM, Bradner JE, Yaffe MB. The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling. *Nature.* 2013 Jun 13;498(7453):246-50. doi: 10.1038/nature12147. Epub 2013 Jun 2.
95. Wu SY, Chiang CM. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13141–5.

## BIBLIOGRAFIA

96. Alpatov R, Lesch BJ, Nakamoto-Kinoshita M, Blanco A, Chen S, Stützer A, Armache KJ, Simon MD, Xu C, Ali M, Murn J, Prsic S, Kutateladze TG, Vakoc CR, Min J, Kingston RE, Fischle W, Warren ST, Page DC, Shi Y. A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. *Cell*. 2014 May 8;157(4):869-81. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.040.
97. Devaiah BN, Lewis BA, Cherman N, Hewitt MC, Albrecht BK, Robey PG, Ozato K, Sims RJ 3rd, Singer DS. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates Serine2 of the RNA Polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(18):6927-32.
98. Chalovich JM, Eisenberg E. Inhibition of actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin without blocking the binding of myosin to actin. *Biophys Chem*. 2005;257(5):2432-7.
99. Campbell RM, Tummino PJ. Cancer epigenetics drug discovery and development: the challenge of hitting the mark. *J Clin Invest*. 2014 Jan 2 [cited 2017 Aug 19];124(1):64-9.
100. Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 May 22 [cited 2017 Aug 19];13(5):337-56.
101. Gallenkamp D, Gelato KA, Haendler B, Weinmann H. Bromodomains and their pharmacological inhibitors. *ChemMedChem*. 2014 Mar [cited 2017 Aug 19];9(3):438-64.
102. Peterlin BM. Transcription elongation takes central stage: The P-TEFb connection. *Cell Cycle*. 2010 Aug 28 [cited 2017 Aug 21];9(15):2981-9.
103. Adelman K, Lis JT. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet*. 2012 Sep 18 [cited 2017 Aug 21];13(10):720-31.
104. Marshall NF, Price DH. Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol*. 1992 May [cited 2017 Aug 21];12(5):2078-90.
105. Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, Hasegawa J, Handa H. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*. 1999 Apr 2 [cited 2017 Aug 21];97(1):41-51.
106. Gaertner B, Zeitlinger J. RNA polymerase II pausing during development. *Development*. 2014 Mar 15 [cited 2017 Aug 21];141(6):1179-83.

107. Price DH. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 2000 Apr [cited 2017 Aug 21];20(8):2629–34.
108. Yang Z, Yik JH, Chen R, He N, Jang MK, Ozato K, Zhou Q. Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell.* 2005 Aug 19 [cited 2017 Aug 21];19(4):535–45.
109. Luo Z, Lin C, Shilatfard A. The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Aug 16 [cited 2017 Aug 21];13(9):543–7.
110. Wang R, You J. Mechanistic Analysis of the Role of Bromodomain-containing Protein 4 (BRD4) in BRD4-NUT Oncoprotein-induced Transcriptional Activation. *J Biol Chem.* 2015 Jan 30 [cited 2017 Aug 19];290(5):2744–58.
111. Maxmen A. Cancer research: Open ambition. *Nature.* 2012 Aug 9 [cited 2017 Aug 19];488(7410):148–50.
112. Wang L, Wu X, Wang R, Yang C4, Li Z, Wang C, Zhang F, Yang P. BRD4 inhibition suppresses cell growth, migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *Biol Res.* 2017 Dec 25 [cited 2017 Jun 1];50(1):19.
113. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I, Philpott M, Munro S, McKeown MR, Wang Y, Christie AL, West N, Cameron MJ, Schwartz B, Heightman TD, La Thangue N, French CA, Wiest O, Kung AL, Knapp S, Bradner JE. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature.* 2010 Dec 23 [cited 2017 Aug 20];468(7327):1067–73.
114. Yang Z, He N, Zhou Q. Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* 2008 Feb 1 [cited 2017 Aug 20];28(3):967–76.
115. Jung M, Gelato KA, Fernández-Montalván A, Siegel S, Haendler B. Targeting BET bromodomains for cancer treatment. *Epigenomics.* 2015 Jun [cited 2018 Jan 28];7(3):487–501.
116. Home - ClinicalTrials.gov. Home - ClinicalTrials.gov. [cited 2018 Jan 28].
117. Hellmark T, Segelmark M. Diagnosis and classification of Goodpasture's disease (anti-GBM). *J Autoimmun.* 2014 Feb [cited 2018 Jan 26];48–49:108–12.



## BIBLIOGRAFIA

118. Al-Lamki RS, Mayadas TN. TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. *Kidney Int.* 2015 Feb [cited 2017 Oct 29];87(2):281–96.
119. Belkina AC, Denis G V. BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012 Jun 22 [cited 2017 Oct 30];12(7):465–77.
120. Yang J, Tian B, Brasier AR. Targeting Chromatin Remodeling in Inflammation and Fibrosis. In: *Advances in protein chemistry and structural biology.* 2017 [cited 2017 Oct 30]. p. 1–36.
121. Ucero AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ramos AM, Berzal S, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol.* 2014 Apr 27 [cited 2017 Oct 31];46(4):765–76.
122. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009 Jun [cited 2017 Oct 31];75(11):1145–52.
123. Rodriguez RM, Suarez-Alvarez B, Salvanés R, Huidobro C, Toraño EG, Garcia-Perez JL, Lopez-Larrea C, Fernandez AF, Bueno C, Menendez P, Fraga MF. Role of BRD4 in hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. *Epigenetics.* 2014 Apr 17 [cited 2017 Oct 31];9(4):566–78.
124. Bollée G, Flamant M, Schordan S, Fligny C, Rumpel E, Milon M, Schordan E, Sabaa N, Vandermeersch S, Galaup A, Rodenas A, Casal I, Sunnarborg SW, Salant DJ, Kopp JB, Threadgill DW, Quaggin SE, Dussaule JC, Germain S, Mesnard L, Endlich K, Boucheix C, Belenfant X, Callard P, Endlich N, Tharaux PL. Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat Med.* 2011 Sep 25 [cited 2017 Nov 23];17(10):1242–50.
125. Esteban V, Ruperez M, Vita JR, López ES, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NFkappaB pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int Suppl.* 2003 Oct [cited 2017 Nov 23];(86):S33-8.
126. Chang Y, Wei W. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2015 Feb [cited 2018 Jan 13];179(2):137–45.

127. Huang B, Yang X-D, Zhou M-M, Ozato K, Chen L-F. Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Mol Cell Biol*. 2009 Mar 1 [cited 2017 Nov 28];29(5):1375–87.
128. Zou Z, Huang B, Wu X, Zhang H, Qi J, Bradner J, et al. Brd4 maintains constitutively active NF- $\kappa$ B in cancer cells by binding to acetylated RelA. *Oncogene*. 2014 May 1 [cited 2017 Nov 28];33(18):2395–404.
129. Alique M, Sánchez-López E, Rayego-Mateos S, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via angiotensin receptor type 1/nuclear factor- $\kappa$ B activation, causes a synergistic effect on interleukin-1- $\beta$ -induced inflammatory responses in cultured mesangial cells. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst*. 2015 Mar 29 [cited 2018 Jan 24];16(1):23–32.
130. Kitching AR, Holdsworth SR. The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Feb 1 [cited 2017 Nov 29];22(2):235–8.
131. Rodrigues-Díez R, Rodrigues-Díez RR, Rayego-Mateos S, Suarez-Alvarez B, Lavoiz C, Stark Aroeira L, Sánchez-López E, Orejudo M, Alique M, Lopez-Larrea C, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M.. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response. *Lab Invest*. 2013 Jul 6 [cited 2017 Nov 29];93(7):812–24.
132. Pindjakova J, Hanley SA, Duffy MM, Sutton CE, Weidhofer GA, Miller MN, Nath KA, Mills KH, Ceredig R, Griffin MD. Interleukin-1 accounts for intrarenal Th17 cell activation during ureteral obstruction. *Kidney Int [Internet]*. 2012 Feb [cited 2017 Nov 29];81(4):379–90.
133. Cheung K, Lu G, Sharma R, Vincek A, Zhang R, Plotnikov AN, Zhang F, Zhang Q1, Ju Y, Hu Y, Zhao L, Han X, Meslamani J, Xu F, Jaganathan A, Shen T, Zhu H, Rusinova E, Zeng L, Zhou J, Yang J, Peng L, Ohlmeyer M, Walsh MJ, Zhang DY, Xiong H, Zhou MM. BET N-terminal bromodomain inhibition selectively blocks Th17 cell differentiation and ameliorates colitis in mice. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2017 Mar 14 [cited 2017 Nov 29];114(11):2952–7.
134. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A RA. CD4+ Regulatory T Cells Control TH17 Responses in a Stat3 Dependent Manner. *Science (80)*. 2009; 326 (November): 986.
135. Butkowski RJ, Wieslander J, Kleppel M, Michael AF, Fish AJ. Basement membrane collagen in the kidney: Regional localization of novel chains related to collagen IV. *Kidney Int*. 1989 May [cited 2017 Jun 17];35(5):1195–202.

## BIBLIOGRAFIA

136. Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lützkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development*. 2004 Mar 31 [cited 2017 Apr 21];131(9):1891–901.
137. Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier M-C, Schedl A, Wegner M. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev*. 2003 Jun 18 [cited 2017 Apr 21];17(13):1677–89.
138. Bennett MR, Czech KA, Arend LJ, Witte DP, Devarajan P, Potter SS. Laser capture microdissection-microarray analysis of focal segmental glomerulosclerosis glomeruli. *Nephron Exp Nephrol*. 2007 Aug 6 [cited 2018 Jan 17];107(1):e30–40.
139. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005 Dec 1 [cited 2017 Dec 10];19(23):2783–810.
140. Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 2000 Apr 17 [cited 2017 Dec 10];19(8):1745–54.
141. Böttinger EP. TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol*. 2007 May [cited 2017 Dec 10];27(3):309–20.
142. Lan HY. Diverse roles of TGF- $\beta$ /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci*. 2011 [cited 2017 Dec 10];7(7):1056–67.
143. Cosgrove D, Kalluri R, Miner J-H, Segal Y, Borza D-B. Choosing a mouse model to study the molecular pathobiology of Alport glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2007 Apr [cited 2018 Jan 28];71(7):615–8.
144. Herzer U, Crocoll A, Barton D, Howells N, Englert C. The Wilms tumor suppressor gene *wt1* is required for development of the spleen. *Curr Biol*. [cited 2017 Dec 3];9(15):837–40.
145. Nicodeme E, Jeffrey KL, Schaefer U, Beinke S, Dewell S, Chung CW, Chandwani R, Marazzi I, Wilson P, Coste H, White J, Kirilovsky J, Rice CM, Lora JM, Prinjha RK, Lee K, Tarakhovsky A. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*. 2010 Dec 23 [cited 2017 Jun 27];468(7327):1119–23.
146. Belkina AC, Nikolajczyk BS, Denis G V. BET protein function is required for inflammation: Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses. *J Immunol*. 2013 Apr 1 [cited 2018 Jan 28];190(7):3670–8.

147. Klein K, Kabala PA, Grabiec AM, Gay RE, Kolling C, Lin LL, Gay S, Tak PP, Prinjha RK, Ospelt C, Reedquist KA. The bromodomain protein inhibitor I-BET151 suppresses expression of inflammatory genes and matrix degrading enzymes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*. 2016 Feb [cited 2018 Jan 28];75(2):422–9.
148. Chung ACK, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011 May 1 [cited 2018 Jan 28];22(5):802–9.
149. Zhang Q, Qian J, Zhu Y. Targeting bromodomain-containing protein 4 (BRD4) benefits rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*. 2015 Aug [cited 2018 Jan 28];166(2):103–8.
150. Meng S, Zhang L, Tang Y, Tu Q, Zheng L, Yu L, Murray D, Cheng J, Kim SH, Zhou X, Chen J. BET Inhibitor JQ1 Blocks Inflammation and Bone Destruction. *J Dent Res*. 2014 Jul 5 [cited 2018 Jan 30];93(7):657–62.
151. Magistri M, Velmeshev D, Makhmutova M, Patel P, Sartor GC, Volmar CH, Wahlestedt C, Faghihi MA1. The BET-Bromodomain Inhibitor JQ1 Reduces Inflammation and Tau Phosphorylation at Ser396 in the Brain of the 3xTg Model of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2016 [cited 2018 Jan 30];13(9):985–95.
152. Gupta J, Kumar S, Li J, Krishna Murthy Karuturi R, Tikoo K. Histone H3 lysine 4 monomethylation (H3K4me1) and H3 lysine 9 monomethylation (H3K9me1): Distribution and their association in regulating gene expression under hyperglycaemic/hyperinsulinemic conditions in 3T3 cells. *Biochimie*. 2012 Dec [cited 2017 Jun 27];94(12):2656–64.
153. Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, Grishin NV, White M, Yang XJ, Zhao Y. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*. 2006 Aug [cited 2017 Nov 11];23(4):607–18.
154. Ott CJ, Kopp N, Bird L, Paranal RM, Qi J, Bowman T, Rodig SJ, Kung AL, Bradner JE, Weinstock DM. BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012 Oct 4 [cited 2018 Jan 28];120(14):2843–52.
155. Belkina AC, Nikolajczyk BS, Denis G V. BET Protein Function Is Required for Inflammation: Brd2 Genetic Disruption and BET Inhibitor JQ1 Impair Mouse Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol*. 2013 Apr 1 [cited 2017 Dec 24];190(7):3670–8.

## BIBLIOGRAFIA

156. Lovén J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*. 2013 Apr 11 [cited 2017 Aug 29];153(2):320–34.
157. Ghizzoni M, Haisma HJ, Maarsingh H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases are crucial regulators in NF- $\kappa$ B mediated inflammation. *Drug Discov Today*. 2011 Jun [cited 2017 Nov 11];16(11–12):504–11.
158. Dekker FJ, Van Den Bosch T, Martin NI. Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases and deacetylases are potential drugs for inflammatory diseases. *Drug Discov Today*. 2014 [cited 2017 Jun 27];19(5):654–60.
159. Zou Z, Huang B, Wu X, Zhang H, Qi J, Bradner J, Nair S, Chen LF. Brd4 maintains constitutively active NF- $\kappa$ B in cancer cells by binding to acetylated RelA. *Oncogene*. 2014 May 1 [cited 2017 Aug 29];33(18):2395–404.
160. Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, Schneider H, Ruiz-Ortega M, Egido J. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(10):2505–12.
161. Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jun [cited 2018 Jan 28];15(6):1514–29.
162. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Jan 19 [cited 2017 Dec 27];12(2):121–32.
163. Huang B, Yang X-D, Lamb A, Chen L-F. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cell Signal*. 2010 Sep [cited 2017 Dec 27];22(9):1282–90.
164. Yang X-D, Tajkhorshid E, Chen L-F. Functional interplay between acetylation and methylation of the RelA subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*. 2010 May 1 [cited 2017 Dec 28];30(9):2170–80.
165. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*. 2004 Sep [cited 2017 Dec 27];6(3):203–8.

166. Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF- $\kappa$ B addiction and its role in cancer: "one size does not fit all". *Oncogene*. 2011 Apr 7 [cited 2017 Dec 27];30(14):1615–30.
167. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. [2006 May 25 [cited 2017 Dec 27];441(7092):431–6.
168. Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell*. 2009 Apr 7 [cited 2017 Dec 27];15(4):283–93.
169. Chen LF, Williams SA, Mu Y, Nakano H, Duerr JM, Buckbinder L, Greene WC. NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol*. 2005 Sep 15 [cited 2017 Dec 26];25(18):7966–75.
170. Hoberg JE, Popko AE, Ramsey CS, Mayo MW. IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol*. 2006 Jan 15 [cited 2017 Dec 26];26(2):457–71.
171. Berger SL. Gene activation by histone and factor acetyltransferases. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Jun [cited 2017 Dec 26];11(3):336–41.
172. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11 [cited 2018 Jan 16];441(7090):235–8.
173. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell [Internet]*. 2010 Mar 19 [cited 2018 Jan 16];140(6):845–58.
174. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008 Jun 19 [cited 2018 Jan 4];453(7198):1051–7.
175. Bäckdahl L, Bushell A, Beck S. Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jan [cited 2018 Jan 4];41(1):176–84.
176. Mele DA, Salmeron A, Ghosh S, Huang H-R, Bryant BM, Lora JM. BET bromodomain inhibition suppresses TH17-mediated pathology. *J Exp Med*. 2013 Oct 21 [cited 2018 Jan 4];210(11):2181–90.

## BIBLIOGRAFIA

177. Bandukwala HS, Gagnon J, Togher S, Greenbaum JA, Lamperti ED, Parr NJ, Molesworth AM, Smithers N, Lee K, Witherington J, Tough DF, Prinjha RK, Peters B, Rao A. Selective inhibition of CD4+ T-cell cytokine production and autoimmunity by BET protein and c-Myc inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* . 2012 Sep 4 [cited 2018 Jan 4];109(36):14532–7.
178. Wang X, Zhang Y, Yang XO, Nurieva RI, Chang SH, Ojeda SS, Kang HS, Schluns KS, Gui J, Jetten AM, Dong C. Transcription of Il17 and Il17f is controlled by conserved noncoding sequence 2. *Immunity*. 2012 Jan 27 [cited 2018 Jan 16];36(1):23–31.
179. Tang X, Peng R, Phillips JE, Deguzman J, Ren Y, Apparsundaram S, Luo Q, Bauer CM, Fuentes ME, DeMartino JA, Tyagi G, Garrido R, Hogaboam CM, Denton CP, Holmes AM, Kitson C, Stevenson CS, Budd DC. Assessment of Brd4 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis lung fibroblasts and in vivo models of lung fibrosis. *Am J Pathol*. 2013 Aug [cited 2018 Jan 29];183(2):470–9.
180. Ding N, Hah N, Yu RT, Sherman MH, Benner C, Leblanc M, He M, Liddle C, Downes M, Evans RM. BRD4 is a novel therapeutic target for liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Dec 7 [cited 2018 Jan 29];112(51):201522163.
181. Niu N, Shao R, Yan G, Zou W. Bromodomain and Extra-terminal (BET) Protein Inhibitors Suppress Chondrocyte Differentiation and Restrain Bone Growth. *J Biol Chem* . 2016 Dec 23 [cited 2018 Jan 29];291(52):26647–57.
182. Zhou B, Mu J, Gong Y, Lu C, Zhao Y, He T, Qin Z. Brd4 inhibition attenuates unilateral ureteral obstruction-induced fibrosis by blocking TGF- $\beta$ -mediated Nox4 expression. *Redox Biol*. 2017;11(December 2016):390–402.
183. Xiong C, Masucci MV, Zhou X, Liu N, Zang X, Tolbert E, Zhao TC4, Zhuang S. Pharmacological targeting of BET proteins inhibits renal fibroblast activation and alleviates renal fibrosis. *Oncotarget*. 2016 Oct 25 [cited 2018 Jan 30];7(43):69291–308.
184. Duan Q, McMahon S, Anand P, Shah H, Thomas S, Salunga HT, Huang Y, Zhang R, Sahadevan A, Lemieux ME, Brown JD, Srivastava D, Bradner JE, McKinsey TA, Haldar SM. BET bromodomain inhibition suppresses innate inflammatory and profibrotic transcriptional networks in heart failure. *Sci Transl Med*. 2017 May 17 [cited 2018 Jan 29];9(390):eaah5084.

185. Jahagirdar R, Attwell S, Marusic S, Bendele A, Shenoy N, McLure KG, et al. RVX-297, a BET Bromodomain Inhibitor, Has Therapeutic Effects in Preclinical Models of Acute Inflammation and Autoimmune Disease. *Mol Pharmacol*. 2017 Dec [cited 2018 Jan 29];92(6):694–706.
186. Reginensi A, Clarkson M, Neirijnck Y, Lu B, Ohyama T, Groves AK, Sock E, Wegner M, Costantini F, Chaboissier MC, Schedl A. SOX9 controls epithelial branching by activating RET effector genes during kidney development. *Hum Mol Genet*. 2011 Mar 15 [cited 2018 Jan 1];20(6):1143–53.
187. Shakya R, Watanabe T, Costantini F. The role of GDNF/Ret signaling in ureteric bud cell fate and branching morphogenesis. *Dev Cell*. 2005 Jan [cited 2018 Jan 1];8(1):65–74.
188. Ling S, Chang X, Schultz L, Lee TK, Chaux A, Marchionni L, Netto GJ, Sidransky D, Berman DM. An EGFR-ERK-SOX9 signaling cascade links urothelial development and regeneration to cancer. *Cancer Res*. 2011 Jun 1 [cited 2018 Jan 1];71(11):3812–21.
189. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5 [cited 2018 Jan 1];102(14):5062–7.
190. Gao L, Sheu TJ, Dong Y, Hoak DM, Zuscik MJ, Schwarz EM, Hilton MJ, O'Keefe RJ, Jonason JH. TAK1 regulates SOX9 expression in chondrocytes and is essential for postnatal development of the growth plate and articular cartilages. *J Cell Sci*. 2013 Dec 15 [cited 2018 Jan 1];126(24):5704–13.
191. Lacraz GPA, Junker JP, Gladka MM, Molenaar B, Scholman KT, Vigil-Garcia M, Versteeg D, de Ruiter H, Vermunt MW, Creighton MP, Huibers MMH, de Jonge N, van Oudenaarden A, van Rooij E. Tomo-seq Identifies SOX9 as a Key Regulator of Cardiac Fibrosis During Ischemic Injury. *Circulation*. 2017 Jul 19 [cited 2017 Aug 30];CIRCULATIONAHA.117.027832.
192. Möbius P, Preidl RHM, Weber M, Amann K, Neukam FW, Wehrhan F. Re-expression of pro-fibrotic, embryonic preserved mediators in irradiated arterial vessels of the head and neck region. *Strahlentherapie und Onkol*. 2017 Aug 15 [cited 2017 Aug 30];
193. Liu Y, Morley M, Brandimarto J, Hannenhalli S, Hu Y, Ashley EA, Tang WH, Moravec CS, Margulies KB, Cappola TP, Li M. MAGNet consortium. RNA-Seq identifies novel myocardial gene expression signatures of heart failure. *Genomics*. 2015 Feb [cited 2017 Aug 30];105(2):83–9.



## BIBLIOGRAFIA

194. Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF- $\beta$  signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2007 May 1 [cited 2018 Feb 5];74(2):196–206.
195. Lan HY. Inhibition of Renal Fibrosis by Gene Transfer of Inducible Smad7 Using Ultrasound-Microbubble System in Rat UUO Model. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun 1 [cited 2018 Jan 9];14(6):1535–48.
196. Hou CC, Wang W, Huang XR, Fu P, Chen TH, Sheikh-Hamad D, Lan HY. Ultrasound-Microbubble-Mediated Gene Transfer of Inducible Smad7 Blocks Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling and Fibrosis in Rat Remnant Kidney. *Am J Pathol*. 2005 Mar [cited 2018 Jan 9];166(3):761–71.
197. Wang J, Zhou F, Li Z, Mei H, Wang Y, Ma H, Shi L, Huang A, Zhang T, Lin Z, Wu G. Pharmacological targeting of BET proteins attenuates radiation-induced lung fibrosis. *Sci Rep*. 2018 Jan 17 [cited 2018 Jan 29];8(1):998.
198. Lochrin SE, Price DK, Figg WD. BET bromodomain inhibitors. A novel epigenetic approach in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014 Dec 2 [cited 2018 Feb 5];15(12):1583–5.
199. Bhadury J, Nilsson LM, Muralidharan SV, Green LC, Li Z, Gesner EM, Hansen HC, Keller UB, McLure KG, Nilsson JA. BET and HDAC inhibitors induce similar genes and biological effects and synergize to kill in Myc-induced murine lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Jul 1 [cited 2018 Feb 5];111(26):E2721–30.
200. Basheer F, Huntly BJP. BET bromodomain inhibitors in leukemia. *Exp Hematol*. 2015 Aug [cited 2018 Feb 5];43(8):718–31.
201. Siebel AL, Trinh SK, Formosa MF, Mundra PA, Natoli AK, Reddy-Luthmoodoo M, Huynh K, Khan AA, Carey AL, van Hall G, Cobelli C, Dalla-Man C, Otvos JD, Rye KA, Johansson J, Gordon A, Wong NC, Sviridov D, Barter P, Duffy SJ, Meikle PJ, Kingwell BA. Effects of the BET-inhibitor, RVX-208 on the HDL lipidome and glucose metabolism in individuals with prediabetes: A randomized controlled trial. *Metabolism*. 2016 Jun [cited 2018 Feb 5];65(6):904–14.
202. Nikolic D, Rizzo M, Mikhailidis DP, Wong NC, Banach M. An evaluation of RVX-208 for the treatment of atherosclerosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015 Oct 3 [cited 2018 Feb 5];24(10):1389–98.

ANEXO